

## Method for the fermentative production of D-pantothenic acid using coryneform bacteria

**Publication number:** EP1006189

**Publication date:** 2000-06-07

**Inventor:** EGGLING LOTHAR DR (DE); THIERBACH GEORG DR (DE); SAHM HERRMANN PROF DR (DE)

**Applicant:** DEGUSSA (DE); KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH (DE)

**Classification:**

- **International:** A23L1/302; A61K31/197; C12N1/21; C12N9/00; C12N9/10; C12N9/88; C12N15/09; C12N15/52; C12N15/60; C12P13/02; C12R1/15; A23L1/302; A61K31/185; C12N1/21; C12N9/00; C12N9/10; C12N9/88; C12N15/09; C12N15/52; C12N15/60; C12P13/00; (IPC1-7): C12N1/21; C12N15/52; C12N9/00; C12N9/10; C12N9/88; C12N15/54; C12N15/60; C12N15/77; C12P13/02; C12R1/15; C12R1/15; C12R1/19

- **European:** C12N9/00L; C12N9/10A2; C12N9/88; C12N15/52; C12P13/02

**Application number:** EP19990123738 19991130

**Priority number(s):** DE19981055312 19981201

**Also published as:**

- US6177264 (B1)
- ZA9907407 (A)
- JP2000166580 (A)
- EP1006189 (A3)
- DE19855312 (A1)

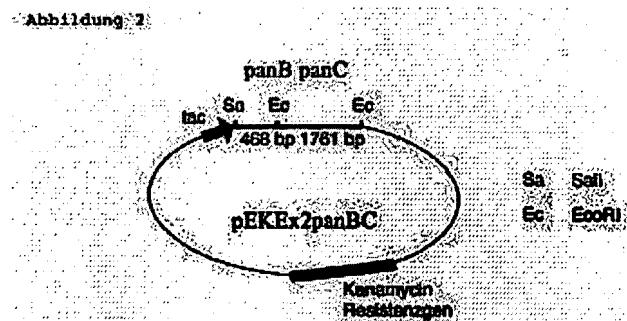
**Cited documents:**

- EP0590857
- US5518906
- EP1006192
- WO0100843
- WO0050624
- [more >>](#)

[Report a data error here](#)

### Abstract of EP1006189

Recombinant *Corynebacterium* DNA (I), present in microorganisms of the *Corynebacterium* genus and comprising at least one of the panB, panC and or ilvD genes, is new. Recombinant *Corynebacterium* DNA (I), present in microorganisms of the *Corynebacterium* genus and comprising at least one of the (i) panB (ketopantothenoyltransferase), (ii) panC (pantothenic acid synthetase), especially the panBC operon, and/or (iii) ilvD (dihydroxyacid dehydratase) genes, and comprising the fully defined 2164, 2164 and/or 2952 base pair sequences, respectively, is new. Independent claims are also included for the following: (1) microorganisms (II), especially *Corynebacterium*, transformed with one or more of (I); (2) shuttle vector pECM3ilvBNCD (III), deposited as *E. coli* DH5 alpha mcr/pECM3ilvBNCD under DSM 12457; (3) shuttle vector pEKEx2panBC (IV), deposited as *E. coli* DH5 alpha mcr/pEKEx3panBC under DSM 12456; and (4) a method (V) for the preparation of pantothenic acid.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide



(19)

Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 1 006 189 A2

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:  
07.06.2000 Patentblatt 2000/23

(51) Int. Cl. 7: C12N 15/52, C12N 15/54,  
C12N 15/60, C12N 15/77,  
C12P 13/02  
// C12N1/21, (C12R1/15, 1:19)

(21) Anmeldenummer: 99123738.9

(22) Anmeldetag: 30.11.1999

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
MC NL PT SE  
Benannte Erstreckungsstaaten:  
AL LT LV MK RO SI  
(30) Priorität: 01.12.1998 DE 19855312  
(71) Anmelder:  
• Degussa-Hüls Aktiengesellschaft  
60287 Frankfurt am Main (DE)

• FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH  
52425 Jülich (DE)

(72) Erfinder:  
• Eggeling, Lothar, Dr.  
52428 Jülich (DE)  
• Thierbach, Georg, Dr.  
33613 Bielefeld (DE)  
• Sahm, Herrmann, Prof.Dr.  
52428 Jülich (DE)

(54) **Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothenäure unter Verwendung coryneformer Bakterien**

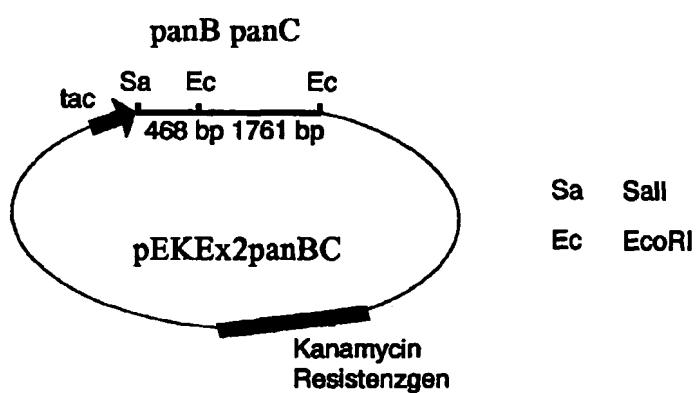
(57) Die Erfindung betrifft in Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* replizierbare, gegebenenfalls rekombinante DNA mit der Herkunft *Corynebacterium*, die zumindest eine der folgenden Nucleotidsequenzen enthält, ausgewählt aus der Gruppe:

- a) codierend für das panB-Gen (Ketopantoathydroxymethyltransferase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1,
- b) codierend für das panC-Gen (Pantothenatsyn-

thetase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1, insbesondere das panBC-Operon und gegebenenfalls c) codierend für das ilvD-Gen (Dihydroxysäuredehydratase), dargestellt durch die SEQ-ID-No.4,

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothenäure unter Verwendung von Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium*, in denen die genannten Gene verstärkt werden.

### Abbildung 2



EP 1 006 189 A2

**Beschreibung****Stand der Technik**

5 [0001] Die Pantothenensäure stellt ein kommerziell bedeutendes Vitamin dar, das in der Kosmetik, der Medizin, der Humanernährung und in der Tierernährung Anwendung findet.

[0002] Pantothenensäure kann durch chemische Synthese oder biotechnologisch durch Fermentation geeigneter Mikroorganismen in geeigneten Nährösungen hergestellt werden. Der Vorteil der biotechnologischen Herstellung durch Mikroorganismen liegt in der Bildung der gewünschten stereo-isomeren D-Form der Pantothenensäure.

10 [0003] Verschiedene Arten von Bakterien, wie z. B. *Escherichia coli*, *Corynebacterium erythrogenes*, *Brevibacterium ammoniagenes* und auch Hefen, wie z. B. *Debaromyces castellii* können, wie in EP-A 0 493 060 gezeigt, in einer Nährösung, die Glucose, DL-Pantoinsäure und  $\beta$ -Alanin enthält, D-Pantothenensäure produzieren. EP-A 0 493 060 zeigt weiterhin, daß bei *Escherichia coli* durch Amplifikation von Pantothenensäure-Biosynthesegenen mittels der Plasmide pFV3 und pFV5 die Bildung von D-Pantothenensäure verbessert wird.

15 [0004] EP-A 0 590 857 betrifft Stämme von *Escherichia coli*, die Resistenzen gegen verschiedene Antimetabolite, wie z. B. Salizylsäure,  $\alpha$ -Ketobuttersäure,  $\beta$ -Hydroxyasparaginsäure etc. tragen und in einer Nährösung, die Glucose und  $\beta$ -Alanin enthält, D-Pantoinsäure und D-Pantothenensäure produzieren. In EP-A 0 590 857 wird weiterhin beschrieben, daß durch Amplifikation von nicht näher definierten Pantothenensäure-Biosynthesegenen aus *E.coli*, die auf dem Plasmid pFV31 enthalten sind, die Produktion von D-Pantoinsäure und D-Pantothenensäure in *E.coli* verbessert werden kann.

20 [0005] In WO 97/10340 wird darüber hinaus gezeigt, daß in Pantothenensäure bildenden Mutanten von *Escherichia coli* durch Erhöhung der Aktivität des Enzyms Acetohydroxysäure-Synthase II, einem Enzym der Valin Biosynthese, die Pantothenensäure-Produktion weiter gesteigert werden kann.

**Aufgabe der Erfindung**

25 [0006] Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt neue Grundlagen für verbesserte Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothenensäure mit Hilfe coryneformer Bakterien bereitzustellen.

**Beschreibung der Erfindung**

30 [0007] Das Vitamin Pantothenensäure stellt ein kommerziell bedeutendes Produkt dar, das in der Kosmetik, der Medizin, der Humanernährung und in der Tierernährung Anwendung findet. Es besteht daher ein allgemeines Interesse daran verbesserte Verfahren zur Herstellung von Pantothenensäure bereitzustellen. Wenn im folgenden Text D-Pantothenensäure oder Pantothenensäure oder Pantothenat erwähnt werden, sind damit nicht 35 nur die freie Säure, sondern auch die Salze der D-Pantothenensäure wie z.B. das Calcium-, Natrium-, Ammonium- oder Kaliumsalz gemeint.

Gegenstand der Erfindung sind in Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* replizierbare, gegebenenfalls rekombinante DNA mit der Herkunft *Corynebacterium*, die zumindest eine der folgenden Nucleotidsequenzen enthält, ausgewählt aus der Gruppe:

40 a) codierend für das *panB*-Gen (Ketopantoathydroxymethyltransferase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1,  
b) codierend für das *panC*-Gen (Pantothenatsynthetase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1, insbesondere das *panBC*-Operon und gegebenenfalls  
c) codierend für das *ilvD*-Gen (Dihydroxysäuredehydratase), dargestellt durch die SEQ-ID-No.4.

45 [0008] Gegenstand der Erfindung sind ebenso replizierbare DNA gemäß dem genannten Anspruch 1 mit:

50 (i) den Nucleotidsequenzen, gezeigt in SEQ-ID-No.1, SEQ-ID-No.4,  
(ii) mindestens einer dieser Sequenzen, die den jeweiligen Sequenzen (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entsprechen oder  
(iii) mindestens einer dieser Sequenzen, die mit den zu jeweiligen Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisieren und gegebenenfalls  
(iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).

55 [0009] Ebenso werden beansprucht coryneforme Mikroorganismen, insbesondere der Gattung *Corynebacterium*, transformiert durch die Einführung einer oder mehrerer replizierbarer DNA-Stücke. Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung von D-Pantothenensäure unter Verwendung, insbesond-

ere diese Säure bereits produzierender coryneformer Bakterien, in denen die Gene panB und panC einzeln oder kombiniert miteinander gegebenenfalls kombiniert mit einer Defektmutation im ilvA-Gen oder einer Verstärkung der Gene ilvBN, ilvC oder ilvD verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

5 [0010] Der Begriff „Verstärkung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man z. B. die Kopienzahl des(der) Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

10 [0011] Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Pantotheninsäure aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen, insbesondere aus Glucose oder Saccharose. Es handelt sich um coryneforme Bakterien z. B. der Gattungen Corynebacterium oder Arthrobacter. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art Corynebacterium glutamicum zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist Aminosäuren zu bilden. Zu dieser Art gehören Wildtypstämme wie z. B. Corynebacterium glutamicum ATCC13032, Brevibacterium flavum ATCC14067, Corynebacterium melassecola ATCC17965 und davon abgeleitete Stämme.

15 [0012] Die Erfinder fanden heraus, dass nach Verstärkung, insbesondere Überexpression, der neu isolierten D-Pantothenatbiosynthesegene panB und panC einzeln oder gemeinsam (panBC-Operon) aus Corynebacterium glutamicum, die für die Enzyme Ketopantothenyltransferase und Pantothenatesynthetase kodieren, in verbesserter Weise D-Pantothenat produziert wird.

20 [0013] Die Erfinder haben weiter festgestellt, daß eine verstärkte Expression des neuen Valinbiosynthesegens ilvD aus Corynebacterium glutamicum, welches für das Enzym Dihydroxysäuredehydratase kodiert, zur erhöhten D-Pantothenatbildung beiträgt. Erfindungsgemäß bewirken neben diesem Gen auch die verstärkte Expression der ilvBN-Gene, die für das Enzym Acetohydroxysäuresynthetase kodieren, und des ilvC-Gens, das für das Enzym Isomeroreduktase kodiert, in Corynebacterium glutamicum eine erhöhte D-Pantothenatbildung.

25 [0014] Zur Erzielung einer Verstärkung (Überexpression) erhöht man z. B. die Kopienzahl der entsprechenden Gene oder mutiert die Promotor- und Regulationsregion, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich die Expression im Verlaufe der fermentativen D-Pantothenatbildung zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte liegen dabei entweder in Plasmidvektoren mit unterschiedlicher Kopienzahl vor oder sind im Chromosom integriert und amplifiziert. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden. Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift EPS 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)) oder im Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

30 [0015] Zur Isolierung der Gene panB und panC aus C. glutamicum wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in E. coli angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990) oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine bekannte Genbank ist die des E. coli K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495 - 508 (1987)) in λ-Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im E.coli K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde. Zur Herstellung einer Genbank von C. glutamicum in E. coli können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC19 (Norlander et al., 1983, Gene, 26: 101-106) verwendet werden. Als Wirt eignen sich besonders solche E. coli-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5αmr, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde.

35 [0016] Die Genbank wird anschließend in einen Indikatorstamm durch Transformation (Hanahan, Journal of Molecular Biology 166, 557-580, 1983) oder Elektroporation (Tauch et.al., 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-347) eingebaut. Der Indikatorstamm zeichnet sich dadurch aus, dass er eine Mutation in dem interessierenden Gen besitzt, die einen detektierbaren Phänotyp z.B. eine Auxotrophie hervorruft. Die Indikatorstämme bzw. Mutanten sind aus publizierten Quellen oder Stammsammlungen erhältlich oder werden gegebenenfalls selbst hergestellt. Im Rahmen

der vorliegenden Erfindung ist die *E. coli* Mutante DV39 (Vallari und Rock, *Journal of Bacteriology* 1985, 164:136-142), die eine Mutation im panC-Gen trägt, von besonderem Interesse. Ein anderes Beispiel für eine Pantothenatsäure-bedürftige *E. coli* Mutante ist der Stamm SJ2, der eine Mutation im panB-Gen trägt und vom Genetic Stock Center der Yale University (New Haven, Connecticut, USA) bezogen werden kann. Ein weiteres Beispiel ist die im Rahmen der vorliegenden Erfindung isolierte *C. glutamicum* Mutante R127/7, die in dem für die Dihydroxysäuredehydratase kodierendem ilvD-Gen defekt ist. Nach Transformation des Indikatorstammes wie z.B. der panB-Mutante SJ2 mit einem rekombinanten Plasmid, welches das interessierende Gen wie z.B. das panB-Gen trägt, und Expression des betreffenden Gens, wird der Indikatorstamm bezüglich der entsprechenden Eigenschaft wie z.B. der Pantothenatsäure-Bedürftigkeit prototroph.

5 [0017] Das dergestalt isolierte Gen bzw. DNA-Fragment kann durch Bestimmung der Sequenz, wie z.B. bei Sanger et al. (*Proceedings of the National of Sciences of the United States of America USA*, 74:5463-5467, 1977) beschrieben, charakterisiert werden.

10 [0018] Auf diese Weise wurde die neue für die Gene panB und panC kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID NO 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurden aus der vorliegenden DNA-15 Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenzen der entsprechenden Enzyme abgeleitet. In SEQ ID NO 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des panB-Genproduktes nämlich der Ketopantoathydroxymethyltransferase und in SEQ ID NO 3 die sich ergebende Aminosäuresequenz des panC-Genproduktes nämlich der Pantothenatsynthetase dargestellt. Weiterhin wurde auf diese Weise die neue für das ilvD-Gen kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID NO 4 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. In SEQ ID NO 20 5 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des ilvD-Genproduktes nämlich der Dihydroxysäuredehydratase dargestellt.

20 [0019] Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID NO 1 und/oder SEQ ID NO 4 durch einen degenerierten genetischen Code ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID NO 1 und/oder SEQ ID NO 4 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (*Journal of Bacteriology* 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (*Gene* 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (*Protein Sciences* 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (*Bio/Technology* 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 und/oder SEQ ID NO 5 ergeben sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

25 [0020] Das dergestalt charakterisierte Gen kann anschließend einzeln oder in Kombination mit anderen in einem geeigneten Mikroorganismus zur Expression gebracht werden. Eine bekannte Methode Gene zu exprimieren bzw. überzuexprimieren besteht darin diese mit Hilfe von Plasmidvektoren zu amplifizieren, die überdies mit Expressionssignalen ausgestattet sein können. Als Plasmidvektoren kommen solche in Frage, die in den entsprechenden Mikroorganismen replizieren können. Für *Corynebacterium glutamicum* kommen z.B. die Vektoren pEKEx1 (Eikmanns et al., *Gene* 102:93-98 (1991)) oder pZ8-1 (Europäische Patentschrift 0 375 889) oder pEKEx2 (Eikmanns et al. *Microbiology* 140: 1817-1828 (1994) oder pECM2 (Jäger et al. *Journal of Bacteriology* 174(16): 5462-5465 (1992)) in Frage. Beispiele für derartige Plasmide sind pEKEx2panBC und pECM3ilvBNCD, die in den Stämmen DH5 $\alpha$ mcr/pEKEx2panBC und DH5 $\alpha$ mcr/pECM3ilvBNCD enthalten sind. Plasmid pEKEx2panBC ist ein *E. coli*/*C. glutamicum* Pendelvektor der die Gene panB und panC trägt. Plasmid pECM3ilvBNCD ist ein *E. coli*/*C. glutamicum* Pendelvektor der neben dem ilvD-Gen weiterhin die Gene ilvBN und ilvC trägt.

30 [0021] Die Erfinder haben weiterhin gefunden, dass sich die Verstärkung der Gene panB und panC einzeln, gemeinsam oder in Kombination mit den Genen ilvBN, ilvC und ilvD in solchen Mikroorganismen vorteilhaft auswirkt, die eine reduzierte Synthese der Aminosäuren Threonin und Isoleucin aufweisen. Diese reduzierte Synthese kann durch Abschwächung oder Ausschaltung der entsprechenden Biosyntheseenzyme bzw. ihrer Aktivitäten erreicht werden. Hierfür kommen zum Beispiel die Enzyme Homoserindehydrogenase, Homoserinkinase, Threoninsynthase oder auch Threonindehydratase in Frage. Eine Möglichkeit Enzyme und deren Aktivitäten abzuschwächen oder auszuschalten sind Mutageneseverfahren.

35 [0022] Hierzu gehören ungerichtete Verfahren, die chemische Reagenzien wie z.B. N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin oder auch UV-Bestrahlung zur Mutagenese benutzen, mit anschließender Suche der gewünschten Mikroorganismen auf Bedürftigkeit für L-Threonin oder L-Isoleucin. Verfahren zur Mutationsauslösung und Mutantensuche sind allgemein bekannt und können unter anderem bei Miller (*A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992)) oder im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) nachgelesen werden.

[0023] Weiterhin gehören hierzu gerichtete rekombinante DNA-Techniken. Mit Hilfe dieser Methoden kann zum Beispiel das für die Threoninhydratase kodierende *ilvA*-Gen im Chromosom deletiert wird. Geeignete Methoden dazu sind bei Schäfer et al. (Gene (1994) 145: 69-73) oder auch Link et al. (Journal of Bacteriology (1998) 179: 6228-6237) beschrieben. Auch können nur Teile des Gens deletiert werden, oder auch mutierte Fragmente des Threoninhydratasegens ausgetauscht werden. Durch Deletion oder Austausch wird so ein Verlust oder eine Reduktion der Threoninhydrataseaktivität erreicht (Möckel et al., (1994) Molecular Microbiology 13: 833-842; Morbach et al., (1996) Applied Microbiology and Biotechnology 45: 612-620). Ein Beispiel für eine derartige Mutante ist der *C. glutamicum* Stamm ATCC13032Δ*ilvA*, der eine Deletion im *ilvA*-Gen trägt.

[0024] Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch-Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Pantothenäure-Produktion kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

[0025] Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Mikroorganismen genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedenster Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies zur zusätzlichen Steigerung der Pantothenäure-Produktion Vorstufen der Pantothenäure wie z. B. Aspartat, β-Alanin; Ketolsovalerat, Ketopantoat, Pantoat und gegebenenfalls deren Salze zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüllt werden.

[0026] Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 50°C und vorzugsweise bei 25°C bis 45°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt bis sich ein Maximum an Pantothenäure gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

[0027] Die Konzentration an gebildeter Pantothenäure kann mit bekannten Verfahren (Velisek; Chromatographic Science 60, 515-560 (1992)) bestimmt werden. Zur mikrobiologischen Bestimmung von Pantothenäure wird gebräuchlicherweise der Stamm *Lactobacillus plantarum* ATCC8014 eingesetzt (U.S. Pharmacopeia 1980; AOAC International 1980). Darüberhinaus werden auch andere Testorganismen, wie z.B. *Pediococcus acidilactici* NCIB6990 zur mikrobiologischen Bestimmung von Pantothenatkonzentrationen eingesetzt (Solberg and Hegna; Methods in Enzymology 62, 201-204 (1979)).

[0028] Folgende Mikroorganismen wurden bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapest Vertrag hinterlegt:

[50] • *Escherichia coli* K12 Stamm DH5αmcr/pEKEx2panBC als DSM12456  
 • *Escherichia coli* K12 Stamm DH5αmcr/pECM3ilvBNCD als DSM12457  
 • *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032Δ*ilvA* als DSM12455

#### Beispiele

[55] [0029] Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

## Beispiel 1

Klonierung, Sequenzierung und Expression der Gene der Pantothenatbiosynthese panB und panC aus *C. glutamicum*

5 1. Klonierung des panB- und des panC-Gens

[0030] Chromosomal DNA von *C. glutamicum* ATCC13032 wurde wie bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9 (1990) 84-87) beschrieben isoliert und mit der Restriktionsendonuklease Sau3A geschnitten. Nach geelektrophoretischer Auf trennung wurden DNA-Fragmente in einem Größenbereich von 3 bis 7 kb bzw. von 9 bis 20 kb extrahiert und 10 nachfolgend in die singuläre BamHI Schnittstelle des Vektors pBR322 ligiert. Mit den Ligationsansätzen wurde der *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$ mcr (Grant et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA, 87 (1990) 4645-4649) transformiert (Hanahan, Journal of Molecular Biology 166 (1983) 557-580). Inserttragende Kolonien wurden anhand ihrer Tetracyclinsensitivität nach Überimpfen auf 10  $\mu$ g/ml Tetracyclin enthaltende LB-Agarplatten identifiziert. Durch Plasmidpräparationen (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold 15 Spring Harbour Laboratory Press) von vereinigten Klonen wurden 8 Gruppen, welche je 400 Plasmide mit einer Insertgröße von 9 bis 20 kb und 9 Gruppen, welche je 500 Plasmide mit einer Insertgröße von 3 bis 7 kb enthielten isoliert. Die *E. coli* panB Mutante SJ2 (Cronan et al. 1982, Journal of Bacteriology 149: 916-922) wurde mit dieser Genbank mittels Elektroporation (Wehrmann et al. 1994, Microbiology 140: 3349-3356) transformiert. Die Transformationsansätze wurden direkt auf CGXII-Medium mit 15 g/l Agar (Keilhauer et al., Journal of Bacteriology (1993) 175: 5595-5603) 20 ausplattiert. Von Klonen, welche in der Lage waren ohne Pantothenatsupplementation zu wachsen, wurde Plasmid-DNA isoliert (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press). Bei 8 Plasmiden konnte durch Retransformation die Fähigkeit, den panB-Defekt der *E. coli* Mutante SJ2 heterolog zu komplementieren, bestätigt werden.

[0031] Mit diesen 8 Plasmiden wurde eine Restriktionskartierung durchgeführt. Einer der untersuchten Plasmidvektoren, im Folgendem pUR1 genannt enthielt ein Insert von 9,3 kb Länge (Abbildung 1). Die Transformation der *E. coli* panC Mutante DV39 (Vallari und Rock 1985, Journal of Bacteriology 164: 136-142) ergab, daß der Vektor pUR1 ebenfalls in der Lage war den panC Defekt dieser Mutante zu komplementieren.

2. Sequenzierung des panB- und des panC-Gens

[0032] Ein 2,2 kb großes Fragment des Inserts (Abbildung 1) von pUR1 wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruchmethode von Sanger et al. sequenziert (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1977) 74: 5463-5467). Hierzu wurden zunächst mittels Exonuklease III Subklone erzeugt, die mit Hilfe von Standard Primern (Universal und reverse primer der Firma Boehringer Mannheim, Deutschland) sequenziert wurden. 30 Die geelektrophoretische Analyse der Sequenzieransätze erfolgte mit dem automatischen Laser-Fluoreszenz-Sequenzergerät (A.L.F.) von Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden). Die erhaltene Nukleotidsequenz wurde mit dem Programm paket HUSAR (Release 4.0, EMBL, Cambridge, GB) analysiert. Die Nukleotidsequenz ist als SEQ ID NO 1 wiedergegeben. Die Analyse ergab die Identifizierung von zwei offenen Leserastern. Ein offenes Leseraster von 813 bp Länge, das als panB-Gen identifiziert wurde, kodiert für ein Polypeptid von 271 Aminosäuren und ist 35 als SEQ ID NO 2 wiedergegeben. Die zweite offene Leseraster, das als panC-Gen identifiziert wurde, umfaßt 837 Basenpaare. Es kodiert für ein Polypeptid von 279 Aminosäuren, das als SEQ ID NO 3 wiedergegeben ist.

40 3. Expression des panB- und des panC-Gens

[0033] Die Gene panB und panC wurden in den *C. glutamicum* Expressionsvektor pEKEx2 kloniert (Eikmanns et al. 1994, Microbiology 140: 1817-1828 (1994)), in welchem die beiden Gene unter der Kontrolle des starken, durch IPTG induzierbaren tac-Promotors vorliegen. Die Klonierung wurde in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst wurde mittels PCR der Anfang des panB Gens amplifiziert. Hierzu wurde mit Hilfe eines entsprechenden Primers 19 bp vor dem Startcodon von panB eine SalI-Schnittstelle eingefügt (Primer 1: 5'GATCGTCGACCATCACATCTATACT-CATGCC 3'). Der zweite Primer wurde so gewählt, daß die panB interne EcoRI Schnittstelle im amplifizierten Fragment enthalten war (Primer 2: 5'ACCCG ATGTGGCCGACAACC 3'). Die PCR wurde mit einer Annealingtemperatur von 62°C und dem Plasmid pUR1 als Matrize nach Sambrook et al. (Molecular cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989)) durchgeführt. Das resultierende 468 bp große PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsendonukleasen SalI und EcoRI geschnitten und in den ebenso behandelten Vektor pEKEx2 ligiert. Mit dem 50 Ligationsansatz wurde der *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$ mcr transformiert. Aus einer Transformante vom Typ DH5 $\alpha$ mcr/pEKEx2panB' wurde der Vektor pEKEx2panB' isoliert.

[0034] Aus dem Plasmid pUR1 wurde nun ein 1761 bp großes, die zweite Hälfte des panBC-Clusters enthaltendes, EcoRI Fragment mittels Restriktionsverdau ausgeschnitten. Dieses wurde in den schon das panB PCR-Produkt enthal-

tenden, zuvor mit EcoRI linearisierten pEKEx2panB' Vektor kloniert. Mit dem entsprechenden Ligationsansatz wurde der *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$ mcr transformiert. Aus einer Transformante vom Typ DH5 $\alpha$ mcr/pEKEx2panBC wurde der Vektor pEKEx2panBC (Abbildung 2) isoliert, in dem das panBC-Gencluster unter der Kontrolle des tac-Promotors vorliegt.

5 Beispiel 2

Klonierung und Sequenzierung des für die Dihydroxsäuredehydratase kodierenden ilvD-Gens aus *C. glutamicum*

10 1. Isolierung einer ilvD Mutante von *C. glutamicum*

[0035] Der Stamm *C. glutamicum* R127 (Haynes 1989, FEMS Microbiology Letters 61: 329-334) wurde mit N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin mutagenisiert (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press). Dazu wurden 5 ml einer über Nacht angezogenen *C. glutamicum* Kultur mit 250  $\mu$ l N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin (5 mg/ml Dimethylformamid) versetzt und 30 Minuten bei 30°C und 200 Upm inkubiert (Adelberg 1958, Journal of Bacteriology 76: 326). Die Zellen wurden anschließend zweimal mit steriler NaCl-Lösung (0,9 %) gewaschen. Durch Replikaplatzierung auf Minimalmediumplatten CGXII mit 15 g/l Agar (Keilhauer et al Journal of Bacteriology 175: 5595-5603), wurden Mutanten isoliert, die nur bei Zugabe von L-Valin, L-Isoleucin und L-Leucin (je 0,1 g/l) wuchsen.

[0036] Die Enzymaktivität der Dihydroxsäuredehydratase wurde im Rohextrakt dieser Mutanten bestimmt. Dazu wurden die Klone in 60 ml LB-Medium kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde einmal mit 0,05 M Kaliumphosphatpuffer gewaschen und im selben Puffer resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte mittels 10 minütiger Ultraschallbehandlung (Branson-Sonifier W-250, Branson Sonic Power Co, Danbury, USA). Anschließend wurden die Zelltrümmer durch eine 30 minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C abgetrennt und der Überstand als Rohextrakt in den Enzymtest eingesetzt. Der Reaktionsansatz des Enzymtests enthielt 0,2 ml 0,25 M Tris/HCl, pH 8, 0,05 ml Rohextrakt, und 0,15 ml 65 mM alpha, $\beta$ -Dihydroxy- $\beta$ -methylvalerat. Die Testansätze wurden bei 30 °C inkubiert, nach 10, 20 und 30 Minuten 200  $\mu$ l Proben genommen und deren Ketomethylvaleratkonzentration mittels HPLC-Analytik bestimmt (Hara et al. 1985, Analytica Chimica Acta 172: 167-173). Wie Tabelle 1 zeigt, weist der Stamm R127/7 keine Dihydroxsäuredehydrataseaktivität auf, wogegen die Isomero-reduktase und Acetohydroxsäuresynthase Aktivitäten als weitere Enzyme der Synthese der verzweigtkettigen Aminosäuren noch vorhanden sind.

35 Tabelle 1

35 Spezifische Aktivitäten ( $\mu$ mol/min und mg Protein) verschiedener Enzyme in <i>C. glutamicum</i> Stämmen			
Stamm	Dihydroxsäure dehydratase	Isomero reduktase	Acetohydroxsäure synthase
R127	0,003	0,05	0,07
R127/7	0,000	0,06	0,09

40 2. Klonierung des ilvD-Gens von *C. glutamicum*

[0037] Chromosomal DNA aus *C. glutamicum* R127 wurde wie bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9 (1990) 84-87) beschrieben isoliert. Diese wurde mit dem Restriktionsenzym Sau3A (Boehringer Mannheim) gespalten und durch Saccharose-Dichte-Gradienten-Zentrifugation (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring. Harbour Laboratory Press) aufgetrennt. Die Fraktion mit dem Fragmentgrößenbereich von etwa 6-10 kb wurde zur Ligation mit dem Vektor pJC1 (Cremer et al., Molecular and General Genetics 220 (1990) 478-480) eingesetzt. Der Vektor pJC1 wurde hierzu mit BamHI linearisiert und dephosphoryliert. Fünf ng davon wurden mit 20 ng der genannten Fraktion der chromosomal DNA ligiert und damit die Mutante R127/7 durch Elektroporation (Haynes und Britz, FEMS Microbiology Letters 61 (1989) 329-334) transformiert. Die Transformanten wurden auf die Fähigkeit getestet auf CGXII Agarplatten ohne Zugabe der verzweigtkettigen Aminosäuren wachsen zu können. Von über 5000 getesteten Transformanten wuchsen nach Replikaplatzierung und zweitägiger Inkubation bei 30°C 8 Klone auf Minimalmediumplatten. Von diesen Klonen wurden Plasmidpräparationen, wie bei Schwarzer et al. (Bio/Technology (1990) 9: 84-87) beschrieben durchgeführt. Restriktionsanalysen der Plasmid-DNA ergaben, daß in allen 8 Klonen dasselbe Plasmid, im Folgendem pRV genannt, enthalten war. Das Plasmid trägt ein Insert von 4,3 kb und wurde durch Retransformation auf seine Fähigkeit die ilvD-Mutante R127/7 zu komplementieren getestet. Durch Subklonierung

wurde der für die Komplementation der Mutante R127/7 verantwortliche Bereich auf ein 2,9 kb Scal/Xhol-Fragment eingegrenzt.

### 3. Sequenzierung des ilvD-Gens

5

**[0038]** Die Nukleinsäuresequenz des 2,9 kb Scal/Xhol-Fragments wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruchmethode von Sanger et al. durchgeführt (Proceedings of the National of Sciences of the United States of America USA (1977) 74: 5463-5467). Dabei wurde der Auto-Read Sequencing kit verwendet (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Die gelelektrophoretische Analyse erfolgte mit dem automatischen Laser-Fluoreszenz Sequenziergerät (A.L.F.) von Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden). Die erhaltene Nukleotidsequenz wurde mit dem Programmpaket HUSAR (Release 4.0, EMBL, Cambridge, GB) analysiert. Die Nukleotidsequenz ist als ID SEQ NO 4 wiedergegeben. Die Analyse ergab ein offenes Leseraster von 1836 Basenpaaren, das als ilvD-Gen identifiziert wurde und für ein Polypeptid von 612 Aminosäuren kodiert, das als SEQ ID NO 5 wiedergegeben ist.

### 15 Beispiel 3

Konstruktion einer ilvA Deletionsmutante von *C. glutamicum*

**[0039]** Der Einbau einer Deletion in das ilvA-Gen von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 wurde mit dem bei Schäfer et al. (Gene 145: 69-73 (1994)) beschriebenen System zum Genaustausch durchgeführt. Zur Konstruktion des Inaktivierungsvektors pK19mobsacB $\Delta$ ilvA wurde zunächst aus dem auf einem EcoRI-Fragment im Vektor pBM21 (Möckel et al. 1994, Molecular Microbiology 13: 833-842) vorliegenden ilvA-Gen ein internes 241 bp BgIII-Fragment entfernt. Hierzu wurde der Vektor mit BgIII geschnitten und, nach Abtrennung des ilvA internen BgIII-Fragmentes mittels Agarosegelektrophorese, religiert. Anschließend wurde aus dem Vektor das unvollständige Gen als EcoRI-Fragment isoliert und in den mit EcoRI linearisierten Vektor pK19mobsacB (Schäfer 1994, Gene 145: 69-73) ligiert. Der erhaltene Inaktivierungsvektor pK19mobsacB $\Delta$ ilvA wurde durch Transformation in den *E. coli* Stamm S 17-1 eingebracht (Hanahan 1983, Journal of Molecular Biology 166: 557-580) und per Konjugation nach *C. glutamicum* ATCC13032 transferiert (Schäfer et al. 1990, Journal of Bacteriology 172: 1663-1666). Es wurden Kanamycin-resistente Klone von *C. glutamicum* erhalten, bei denen der Inaktivierungsvektor im Genom integriert vorlag. Um auf die Excision des Vektors zu selektionieren, wurden Kanamycin-resistente Klone auf Saccharose-haltigem LB-Medium ((Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press)) mit 15 g/l Agar, 2% Glucose/10% Saccharose) ausplattiert und Kolonien erhalten, welche den Vektor durch ein zweites Rekombinationsereignis wieder verloren haben (Jäger et al. 1992, Journal of Bacteriology 174: 5462-5465). Durch Überimpfen auf Minimalmediumplatten (Medium CGXII mit 15 g/l Agar (Keilhauer et al., Journal of Bacteriology 175 (1993) 5595-5603)) mit und ohne 2 mM L-Isoleucin, bzw. mit und ohne 50  $\mu$ g/ml Kanamycin wurden 36 Klone isoliert, welche durch die Excision des Vektors Kanamycin sensitiv und Isoleucin auxotroph waren und bei denen nun das unvollständige ilvA Gen ( $\Delta$ ilvA-Allel) im Genom vorlag. Einer dieser Klone wurde als Stamm ATCC13032 $\Delta$ ilvA bezeichnet und weiter verwendet.

### Beispiel 4

40

Expression der Gene ilvBN, ilvC und ilvD in *C. glutamicum*

**[0040]** Die Gene der Acetohydroxysäuresynthase (ilvBN) und der Isomeroreduktase (ilvC) (Cordes et al. 1992, Gene 112: 113-116 und Keilhauer et al. 1993, Journal of Bacteriology 175: 5595-5603) und der Dihydroxysäuredehydratase (ilvD) (Beispiel 2) wurden zur Expression in den Vektor pECM3 kloniert. Der Vektor pECM3 ist ein Derivat von pECM2 (Jäger et al. 1992, Journal of Bacteriology 174: 5462-5465), das durch Deletion des ca. 1 kbp langen BamHI/BgIII DNA-Fragmentes entstand, welches das Kanamycinresistenzgen trägt.

**[0041]** In dem Vektor pKK5 (Cordes et al. 1992, Gene 112: 113-116) lagen die Gene ilvBNC bereits im Vektor pJC1 (Cremer et al. 1990, Molecular and General Genetics 220: 478-480) kloniert vor. Aus diesem wurde ein 5,7 kb XbaI-ilvBNC-Fragment isoliert und zusammen mit einem, das ilvD-Gen enthaltende, 3,1 kb-XbaI Fragment des Vektors pRV in den mit XbaI linearisierten Vektor pECM3 eingebracht. Der Ligationsansatz wurde hierbei in den *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$ mcr transformiert. Aus einer Transformante vom Typ DH5 $\alpha$ mcr/pECM3ilvBNCD wurde das Plasmid pECM3ilvBNCD (Abbildung 3) erhalten.

**[0042]** Mittels Elektroporation (Haynes 1989, FEMS Microbiology Letters 61: 329-334) und Selektion auf Chloramphenicolresistenz wurde das Plasmid pECM3ilvBNCD in den Stamm ATCC13032 $\Delta$ ilvA eingebracht und der Stamm ATCC13032 $\Delta$ ilvA/pECM3ilvBNCD erhalten. Weiterhin wurde mittels Elektroporation (Haynes 1989, FEMS Microbiology Letters 61: 329-334) und Selektion auf Kanamycinresistenz das Plasmid pEKEx2panBC in den Stamm ATCC13032 und in den Stamm ATCC13032 $\Delta$ ilvA eingebracht und die Stämme ATCC13032/pEKEx2panBC und

ATCC13032ΔilvA/pEKEx2panBC erhalten. In den Stamm ATCC13032ΔilvA/pECM3ilvBNCD wurden mittels Elektroporation (Haynes 1989, FEMS Microbiology Letters 61: 329-334) und Selektion auf Kanamycin und Chloramphenicol die Plasmide pEKEx2panBC und pEKEX2 eingebracht. Auf diese Weise entstanden die Stämme ATCC13032ΔilvA/pECM3ilvBNCD pEKEX2 und ATCC13032ΔilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2panBC.

5

#### Beispiel 5

Konstruktion einer Pantothenäsäure bedürftigen panC-Mutante von *C. glutamicum*

10 [0043] Es wurde mit Hilfe des Inaktivierungsvektors pK18mob (Schäfer et al. 1994, Gene 145: 69-73) eine *C. glutamicum* R127 panC Mutante erzeugt.

[0044] Zur Konstruktion des panC-Inaktivierungsvektors wurde zunächst ein 168 bp großes, zentrales Fragment des panC-Gens (Nukleotid 265-432 des 837 bp umfassenden Gens) von *C. glutamicum* mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Als Matrize diente hier der Vektor pUR1 (s. Beispiel 6); als Primer wurden die beiden 15 20mere Primer 1 und Primer 2 eingesetzt: Primer 1 5' GTTCGCACCCGATGTGGAGG 3', Primer 2 5' ATGCACGAT-CAGGGCGCACC 3'. Die PCR wurde nach Sambrook et al. (Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press) mit einer Annealingtemperatur von 55°C durchgeführt. Das erhaltene Fragment wurde nach Zwischenklonierung in die SmaI Schnittstelle des Vektors pUC18, als EcoRI/Sall Fragment gerichtet in den Inaktivierungsvektor pK18mob (Schäfer et al. 1994, Gene 145: 69-73) ligiert. Der so erhaltene Vektor pK18mob'panC' wurde 20 zur Transformation des *E. coli*-Stammes S 17-1 benutzt und nachfolgend per Konjugation in *C. glutamicum* R127 eingebracht. Durch Selektion auf Kanamycinresistenz wurden so Klone von *C. glutamicum* R127 erhalten, bei denen der Integrationsvektor durch ein homologes Rekombinationsereignis ins panC-Gen integriert ist. Der so erhaltene Stamm R12YpanC::pK18mob'panC' ist zur D-Pantothenatbestimmung geeignet.

25 Beispiel 6

Quantitative Bestimmung von D-Pantothenat

30 [0045] Zur quantitativen Bestimmung von D-Pantothenat wurde die *C. glutamicum* panC Mutante R127panC::pK18mob'panC' konstruiert (siehe Beispiel 5), deren Wachstum direkt von der D-Pantothenat Konzentration des Mediums abhängig ist. Dieser Stamm ist Pantothenäsäure auxotroph und zeigt bei Supplementation mit β-Alanin und D-Pantoat kein Wachstum.

[0046] Zur Bestimmung von Pantothenat mit diesem Indikatorstamm wurde CGXII-Medium (Keilhauer et al., Journal of Bacteriology (1993) 175: 5595-5603) als Testmedium eingesetzt. Dazu wurden je 3 ml 4/3 fach konzentriertes 35 CGXII-Medium in einem Inkubationsröhrlchen (Falcon 2057, Becton and Dickinson, New Jersey, USA) mit 1 ml Pantothenäsäure-haltiger, steriler Eich- oder Probelösung versetzt und mit dem Indikatorstamm inkuliert. Als Inokulum wurden jeweils 60 µl einer Glyzerinkultur des Indikatorstammes eingesetzt. Nach 40 stündiger Inkubation bei 30°C wurde 40 die Zelldichte (OD<sub>600</sub>) (Novaspec 4049 Spectrophotometer, LKB Biochrom, Cambridge, GB) der Testansätze bestimmt und mittels einer Eichkurve die Pantothenäsäurekonzentration ermittelt. Der Stamm weist bis zu einer Konzentration von 25 µg/l eine lineare Abhängigkeit des Wachstums von der Pantothenatkonzentration auf, bei einer optischen Dichte von 0,5 bis 10. Zur Herstellung der Glyzerinkultur des Indikatorstammes wurde dieser Stamm auf unsupplementiertem CGXII-Medium 24 Stunden inkubiert (Aushungerung an D-Pantothenat). 1050 µl der Kultur wurden anschließend mit 700 µl Glyzerin versetzt. Von dieser bei -70°C zwischengefrorenen Glyzerinkultur wurden 60 µl zu Bestimmung von D-Pantothenat, wie zuvor beschrieben benutzt. Als Referenz wurde Na-Pantothenat verwendet, das von der Firma Sigma 45 (Deisenhofen, Deutschland) bezogen wurde.

#### Beispiel 7

Produktion von D-Pantothenat mit verschiedenen *C. glutamicum* Stämmen

50

[0047] Zur Untersuchung ihrer Pantothenatbildung wurden die Stämme ATCC13032, ATCC13032/pEKEx2panBC, ATCC13032ΔilvA und ATCC13032ΔilvA/pEKEx2panBC in 60 ml Brain Heart Infusion-Medium (Difco Laboratories, Detroit, USA) für 14 Stunden bei 30°C vorkultiviert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 0,9% NaCl-Lösung (w/v) gewaschen und mit dieser Suspension je 60 ml CgXII-Medium so angeimpft, daß die OD600 von 0,5 betrug. Das 55 Medium war identisch mit dem bei Keilhauer et al., (Journal of Bacteriology (1993) 175: 5595-5603) beschriebenen Medium, enthielt aber zusätzlich 2 mM L-Isoleucin. Das von Keilhauer et al. beschriebene Medium CgXII ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2

Zusammensetzung des Mediums CGXII	
Komponente	Konzentration
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20 g/L
Harnstoff	5 g/L
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 g/L
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1 g/L
$\text{Mg}_2\text{O}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,25 g/L
3-Morpholinopropansulfonsäure	42 g/L
$\text{CaCl}_2$	10 mg/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	10 mg/L
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10 mg/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1 mg/L
$\text{CuSO}_4$	0,2 mg/L
$\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,02 mg/L
Biotin (pH7)	0,2 mg/L
Glukose	40 g/L
Protocatechusäure	0,03 mg/L

30

**[0048]** Bei der Kultivierung der Stämme ATCC13032/pEKEx2panBC und Stammes ATCC13032ΔilvA/pEKEx2panBC wurde das Medium nach 5 Stunden zusätzlich mit 1 mM Isopropylthio-β-D-galactosid versetzt. Nach 24 stündiger Kultivierung wurden Proben genommen, die Zellen abzentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert. Die Pantothenatkonzentration des Überstands wurde mit Hilfe des im Beispiel 6 beschriebenen Pantothenat-tests bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

35

Tabelle 3

D-Pantothenatbildung in verschiedenen <i>C. glutamicum</i> Stämmen	
Stamm	D-Pantothenat (mg/l)
ATCC13032	0,01
ATCC13032/pEKEx2panBC	0,03
ATCC13032ΔilvA	0,06
ATCC13032ΔilvA/pEKEx2panBC	0,3

50 Beispiel 9

Produktion von D-Pantothenat mit verschiedenen *C. glutamicum* Stämmen bei β-Alanin Zugabe

**[0049]** Zur Quantifizierung der Pantothenatbildung wurden die Stämme ATCC13032ΔilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2 und ATCC13032ΔilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2panBC in 60 ml Brain Heart Infusion-Medium(Difco Laboratories, Detroit, USA) mit 25 mg/l Kanamycin und 3 mg/l Chloramphenicol für 14 Stunden bei 30°C vorkultiviert, zweimal mit 0,9% NaCl-Lösung (w/v) gewaschen und mit dieser Suspension je 60 ml CgXII-Medium so angeimpft, daß die OD<sub>600</sub> 0,5 betrug. Das Medium enthielt hierbei 2 mM L-Isoleucin, 25 mg/l Kanamycin, 3 mg/l Chloramphenicol und β-Alanin in

einer Endkonzentration von 20 mM. Nach 5 stündiger Kultivierung wurde dem Medium jeweils IPTG (Isopropylthio- $\beta$ -D-galactosid) in einer Endkonzentration von 1 mM zugefügt. Nach 49 und 74 Stunden wurde eine Probe entnommen, die Zellen wurden abzentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert. Die Pantothenatkonzentration des Überstands wurde wie in Beispiel 6 beschrieben bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

5

Tabelle 4

D-Pantothenatakkumulation in verschiedenen Stämmen von <i>C. glutamicum</i>			
10	Stamm	D-Pantothenat [mg/l] nach einer Inkubationszeit von	
		49 Stunden	74 Stunden
15	ATCC13032 $\Delta$ ilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2	80	100
	ATCC13032 $\Delta$ ilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2panBC	920	980

20

25

30

35

40

45

50

55

SEQUENZPROTOKOLL

5

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Degussa Aktiengesellschaft
- (B) STRASSE: Weissfrauenstr. 9
- (C) ORT: Frankfurt am Main
- (D) BUNDESLAND: Hessen
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D-60311

10

- (A) NAME: Forschungszentrum Juelich GmbH
- (B) STRASSE: Leo-Brandt Strasse
- (C) ORT: Juelich
- (D) BUNDESLAND: Nordrhein-Westfalen
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D-52425

15

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zur  
fermentativen Herstellung von D-Pantothensaeure  
unter Verwendung coryneformer Bakterien

20

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 5

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRAEGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version  
#1.30 (EPA)

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LAENGE: 2164 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

30

(ii) ART DES MOLEKUELS: Genom-DNA

35

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

40

(vi) URSPRUNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Corynebacterium glutamicum
- (B) STAMM: ATCC13032

45

5 (ix) MERKMAL:  
 (A) NAME/SCHLUESSEL: CDS  
 (B) LAGE:351..1163  
 (D) SONSTIGE ANGABEN:/codon\_start= 351  
 /EC\_number= 4.1.2.12  
 /product=  
 "Ketopantoathydroxymethyltransferase"  
 /gene= "panB"

10 (ix) MERKMAL:  
 (A) NAME/SCHLUESSEL: CDS  
 (B) LAGE:1166..2002  
 (D) SONSTIGE ANGABEN:/codon\_start= 1166  
 /EC\_number= 6.3.2.1  
 /product= "Pantothenatsynthetase"  
 /gene= "panC"

15 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GCTTCGGGGT ACCAATTCTT TTAAGAACCA TCAGATCAAT CTGTTGACA TTCTCGGCCA	60
GATTCAGCTT TTCGGTAAGG ACGAAACACT TTCACTTGAA TCGGCAGCAA AGTTTCTTAA	120
20 AGTTTCTAAG GCAACTGCAA CGAGGTATTT TAGAACTCTC CGAGAAATGG AATTAGTTCA	180
CGAGGGTCAGC AAACGCCCTT TGCGGTTTGC GCTCACGGAT AAAGGTCGTG AGATAGTAGG	240
TCTTGAGGTA AAAATTGAC TCCATACGA GAACTTAATC GAGCAACACC CCTGAACAGT	300
25 GAATCAAATC GGAATTATTATT TATTCTGAGC TGGTCATCAC ATCTATACTC ATG CCC Met Pro 1	356
ATG TCA GGC ATT GAT GCA AAG AAA ATC CGC ACC CGT CAT TTC CGC GAA Met Ser Gly Ile Asp Ala Lys Lys Ile Arg Thr Arg His Phe Arg Glu	404
5 10 15	
30 GCT AAA GTA AAC GGC CAG AAA GTT TCG GTT CTC ACC AGC TAT GAT GCG Ala Lys Val Asn Gly Gln Lys Val Ser Val Leu Thr Ser Tyr Asp Ala	452
20 25 30	
CTT TCG GCG CGC ATT TTT GAT GAG GCT GGC GTC GAT ATG CTC CTT GTT Leu Ser Ala Arg Ile Phe Asp Glu Ala Gly Val Asp Met Leu Leu Val	500
35 40 45 50	
35 GGT GAT TCC GCT AAC GTT GTG CTG GGT CGC GAT ACC ACC TTG TCG Gly Asp Ser Ala Ala Asn Val Val Leu Gly Arg Asp Thr Thr Leu Ser	548
55 60 65	
40 ATC ACC TTG GAT GAG ATG ATT GTG CTG GCC AAG GCG GTG ACG ATC GCT Ile Thr Leu Asp Glu Met Ile Val Leu Ala Lys Ala Val Thr Ile Ala	596
70 75 80	
ACG AAG CGT GCG CTT GTG GTG GTT GAT CTG CCG TTT GGT ACC TAT GAG Thr Lys Arg Ala Leu Val Val Val Asp Leu Pro Phe Gly Thr Tyr Glu	644
85 90 95	
45 GTG AGC CCA AAT CAG GCG GTG GAG TCC GCG ATC CGG GTC ATG CGT GAA Val Ser Pro Asn Gln Ala Val Glu Ser Ala Ile Arg Val Met Arg Glu	692
100 105 110	
ACG GGT GCG GCT GCG GTG AAG ATC GAG GGT GGC GTG GAG ATC GCG CAG	740

50

55

	Thr Gly Ala Ala Ala Val Lys Ile Glu Gly Gly Val Glu Ile Ala Gln		
115	120	125	
130			
5	ACG ATT CGA CGC ATT GTT GAT GCT GGA ATT CCG GTT GTC GGC CAC ATC	788	
	Thr Ile Arg Arg Ile Val Asp Ala Gly Ile Pro Val Val Gly His Ile		
	135	140	145
	GGG TAC ACC CCG CAG TCC GAG CAT TCC TTG GGC GGC CAC GTG GTT CAG	836	
	Gly Tyr Thr Pro Gln Ser Glu His Ser Leu Gly Gly His Val Val Gln		
10	150	155	160
	GGT CGT GGC GCG AGT TCT GGA AAG CTC ATC GCC GAT GCC CGC GCG TTG	884	
	Gly Arg Gly Ala Ser Ser Gly Lys Leu Ile Ala Asp Ala Arg Ala Leu		
	165	170	175
15	GAG CAG GCG GGT GCG TTT GCG GTT GTG TTG GAG ATG GTT CCA GCA GAG	932	
	Glu Gln Ala Gly Ala Phe Ala Val Val Leu Glu Met Val Pro Ala Glu		
	180	185	190
	GCA GCG CGC GAG GTT ACC GAG GAT CTT TCC ATC ACC ACT ATC GGA ATC	980	
	Ala Ala Arg Glu Val Thr Glu Asp Leu Ser Ile Thr Thr Ile Gly Ile		
	195	200	205
20	195	200	210
	GGT GCC GGC AAT GGC ACA GAT GGG CAG GTT TTG GTG TGG CAG GAT GCC	1028	
	Gly Ala Gly Asn Gly Thr Asp Gly Gln Val Leu Val Trp Gln Asp Ala		
	215	220	225
	TTC GGC CTC AAC CGC GGC AAG AAG CCA CGC TTC GTC CGC GAG TAC GCC	1076	
	Phe Gly Leu Asn Arg Gly Lys Lys Pro Arg Phe Val Arg Glu Tyr Ala		
25	230	235	
	ACC TTG GGC GAT TCC TTG CAC GAC GCC GCG CAG GCC TAC ATC GCC GAT	1124	
	Thr Leu Gly Asp Ser Leu His Asp Ala Ala Gln Ala Tyr Ile Ala Asp		
	245	250	255
30	ATC CAC GCG GGT ACC TTC CCA GGC GAA GCG GAG TCC TTT TA ATG CAG	1171	
	Ile His Ala Gly Thr Phe Pro Gly Glu Ala Glu Ser Phe Met Gln		
	260	265	270
	1		
	GTA GCA ACC ACA AAG CAG GCG CTT ATC GAC GCC CTC CTC CAC CAC AAA	1219	
	Val Ala Thr Thr Lys Gln Ala Leu Ile Asp Ala Leu Leu His His Lys		
	5	10	15
35	TCC GTC GGG CTC GTC CCC ACC ATG GGT GCG CTA CAC AGC GGA CAC GCC	1267	
	Ser Val Gly Leu Val Pro Thr Met Gly Ala Leu His Ser Gly His Ala		
	20	25	30
40	TCG TTG GTT AAA GCA GCA CGC GCT GAA AAC GAC ACT GTT GTA GCC AGT	1315	
	Ser Leu Val Lys Ala Ala Arg Ala Glu Asn Asp Thr Val Val Ala Ser		
	35	40	45
	50		
	ATT TTT GTC AAT CCC CTG CAG TTT GAA GCA CTC GGT GAT TGC GAT GAT	1363	
	Ile Phe Val Asn Pro Leu Gln Phe Glu Ala Leu Gly Asp Cys Asp Asp		
	55	60	65
45	TAC CGC AAC TAT CCC CGC CAA CTC GAC GCC GAT TTA GCA CTG CTT GAA	1411	
	Tyr Arg Asn Tyr Pro Arg Gln Leu Asp Ala Asp Leu Ala Leu Glu		
	70	75	80
	GAG GCA GGT GTG GAT ATT GTG TTC GCA CCC GAT GTG GAG GAA ATG TAC	1459	
	Glu Ala Gly Val Asp Ile Val Phe Ala Pro Asp Val Glu Glu Met Tyr		
	85	90	95
50	CCC GGT GGC TTG CCA CTA GTG TGG GCG CGC ACC GGT TCC ATC GGA ACA	1507	
	Pro Gly Gly Leu Pro Leu Val Trp Ala Arg Thr Gly Ser Ile Gly Thr		
	100	105	110

EP 1 006 189 A2

	AAA TTG GAG GGT GCC AGC AGG CCT GGC CAT TTC GAT GGT GTG GCT ACC Lys Leu Glu Gly Ala Ser Arg Pro Gly His Phe Asp Gly Val Ala Thr 115 120 125 130	1555
5	GTG GTG GCG AAG CTG TTC AAT TTG GTG CGC CCT GAT CGT GCA TAT TTT Val Val Ala Lys Leu Phe Asn Leu Val Arg Pro Asp Arg Ala Tyr Phe 135 140 145	1603
	GGA CAA AAA GAT GCT CAG CAG GTT GCG GTG ATT CGG CGA TTG GTT GCC Gly Gln Lys Asp Ala Gln Gln Val Ala Val Ile Arg Arg Leu Val Ala 150 155 160	1651
10	GAT CTA GAC ATT CCC GTG GAG ATT CGT CCC GTT CCG ATT ATT CGT GGC Asp Leu Asp Ile Pro Val Glu Ile Arg Pro Val Pro Ile Ile Arg Gly 165 170 175	1699
15	GCC GAT GGC TTA GCC GAA TCC AGC CGC AAT CAA CGT CTT TCT GCG GAT Ala Asp Gly Leu Ala Glu Ser Ser Arg Asn Gln Arg Leu Ser Ala Asp 180 185 190	1747
	CAG CGA GCG CAA GCT CTG GTG CTG CCG CAG GTG TTG AGT GGG TTG CAG Gln Arg Ala Gln Ala Leu Val Leu Pro Gln Val Leu Ser Gly Leu Gln 195 200 205 210	1795
20	CGT CGA AAA GCA GCT GGT GAA GCG CTA GAT ATC CAA GGT GCG CGC GAC Arg Arg Lys Ala Ala Gly Glu Ala Leu Asp Ile Gln Gly Ala Arg Asp 215 220 225	1843
	ACC TTG GCC AGC GCC GAC GGC GTG CGC TTG GAT CAC CTG GAA ATT GTC Thr Leu Ala Ser Ala Asp Gly Val Arg Leu Asp His Leu Glu Ile Val 230 235 240	1891
25	GAT CCA GCC ACC CTC GAA CCA TTA GAA ATC GAC GGC CTG CTC ACC CAA Asp Pro Ala Thr Leu Glu Pro Leu Glu Ile Asp Gly Leu Leu Thr Gln 245 250 255	1939
30	CCA GCG TTG GTG GTC GGC GCG ATT TTC GTG GGG CCG GTG CGG TTG ATC Pro Ala Leu Val Val Gly Ala Ile Phe Val Gly Pro Val Arg Leu Ile 260 265 270	1987
	GAC AAT ATC GAG CTC TAGTACCAAC CCTGCGTTGC AGCACGCAGC TTTCGCATAAC Asp Asn Ile Glu Leu 275	2042
35	CGCTGCTCAG CTCAGTGTTC TTAGGTGCGC GGTGCGGATC GGAACCGGGA GTTGGCCACT GCGGTGGCGT GGCTCACCC GACAGCGCCC ATGCCGCCTG ACGAGCTGCA CCCAACGCCA CA	2102 2162 2164
40	(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:	
	(i) SEQUENZKENNZEICHEN: (A) LAENGE: 271 Aminosaeuren (B) ART: Aminosaeure (D) TOPOLOGIE: linear	
45	(iii) ART DES MOLEKUELS: Protein (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:	
	Met Pro Met Ser Gly Ile Asp Ala Lys Lys Ile Arg Thr Arg His Phe 1 5 10 15	
50	Arg Glu Ala Lys Val Asn Gly Gln Lys Val Ser Val Leu Thr Ser Tyr 20 25 30	
	Asp Ala Leu Ser Ala Arg Ile Phe Asp Glu Ala Gly Val Asp Met Leu	

	35	40	45
5	Leu Val Gly Asp Ser Ala Ala Asn Val Val Leu Gly Arg Asp Thr Thr		
	50	55	60
	Leu Ser Ile Thr Leu Asp Glu Met Ile Val Leu Ala Lys Ala Val Thr		
	65	70	75
	Ile Ala Thr Lys Arg Ala Leu Val Val Val Asp Leu Pro Phe Gly Thr		
	85	90	95
10	Tyr Glu Val Ser Pro Asn Gln Ala Val Glu Ser Ala Ile Arg Val Met		
	100	105	110
	Arg Glu Thr Gly Ala Ala Val Lys Ile Glu Gly Gly Val Glu Ile		
	115	120	125
15	Ala Gln Thr Ile Arg Arg Ile Val Asp Ala Gly Ile Pro Val Val Gly		
	130	135	140
	His Ile Gly Tyr Thr Pro Gln Ser Glu His Ser Leu Gly Gly His Val		
	145	150	155
20	Val Gln Gly Arg Gly Ala Ser Ser Gly Lys Leu Ile Ala Asp Ala Arg		
	165	170	175
	Ala Leu Glu Gln Ala Gly Ala Phe Ala Val Val Leu Glu Met Val Pro		
	180	185	190
25	Ala Glu Ala Ala Arg Glu Val Thr Glu Asp Leu Ser Ile Thr Thr Ile		
	195	200	205
	Gly Ile Gly Ala Gly Asn Gly Thr Asp Gly Gln Val Leu Val Trp Gln		
	210	215	220
	Asp Ala Phe Gly Leu Asn Arg Gly Lys Lys Pro Arg Phe Val Arg Glu		
	225	230	235
30	240		
	Tyr Ala Thr Leu Gly Asp Ser Leu His Asp Ala Ala Gln Ala Tyr Ile		
	245	250	255
	Ala Asp Ile His Ala Gly Thr Phe Pro Gly Glu Ala Glu Ser Phe		
	260	265	270
35			
	(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:		
	(i) SEQUENZKENNZEICHEN:		
	(A) LAENGE: 279 Aminosaeuren		
	(B) ART: Aminosaeure		
40	(D) TOPOLOGIE: linear		
	(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein		
	(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:		
	Met Gln Val Ala Thr Thr Lys Gln Ala Leu Ile Asp Ala Leu Leu His		
	1	5	10
45	15		
	His Lys Ser Val Gly Leu Val Pro Thr Met Gly Ala Leu His Ser Gly		
	20	25	30
	His Ala Ser Leu Val Lys Ala Ala Arg Ala Glu Asn Asp Thr Val Val		
	35	40	45
50	Ala Ser Ile Phe Val Asn Pro Leu Gln Phe Glu Ala Leu Gly Asp Cys		
	50	55	60
	Asp Asp Tyr Arg Asn Tyr Pro Arg Gln Leu Asp Ala Asp Leu Ala Leu		

65	70	75	80	
	Leu Glu Glu Ala Gly Val Asp Ile Val Phe Ala Pro Asp Val Glu Glu			
5	85	90	95	
	Met Tyr Pro Gly Gly Leu Pro Leu Val Trp Ala Arg Thr Gly Ser Ile			
	100	105	110	
	Gly Thr Lys Leu Glu Gly Ala Ser Arg Pro Gly His Phe Asp Gly Val			
10	115	120	125	
	Ala Thr Val Val Ala Lys Leu Phe Asn Leu Val Arg Pro Asp Arg Ala			
	130	135	140	
	Tyr Phe Gly Gln Lys Asp Ala Gln Gln Val Ala Val Ile Arg Arg Leu			
	145	150	155	160
15	Val Ala Asp Leu Asp Ile Pro Val Glu Ile Arg Pro Val Pro Ile Ile			
	165	170	175	
	Arg Gly Ala Asp Gly Leu Ala Glu Ser Ser Arg Asn Gln Arg Leu Ser			
	180	185	190	
20	Ala Asp Gln Arg Ala Gln Ala Leu Val Leu Pro Gln Val Leu Ser Gly			
	195	200	205	
	Leu Gln Arg Arg Lys Ala Ala Gly Glu Ala Leu Asp Ile Gln Gly Ala			
	210	215	220	
25	Arg Asp Thr Leu Ala Ser Ala Asp Gly Val Arg Leu Asp His Leu Glu			
	225	230	235	240
	Ile Val Asp Pro Ala Thr Leu Glu Pro Leu Glu Ile Asp Gly Leu Leu			
	245	250	255	
	Thr Gln Pro Ala Leu Val Val Gly Ala Ile Phe Val Gly Pro Val Arg			
30	260	265	270	
	Leu Ile Asp Asn Ile Glu Leu			
	275			

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

35	(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
	(A) LAENGE: 2952 Basenpaare
	(B) ART: Nucleotid
	(C) STRANGFORM: Doppelstrang
	(D) TOPOLOGIE: linear
40	(ii) ART DES MOLEKUELS: Genom-DNA
	(iii) HYPOTHETISCH: NEIN
	(iv) ANTISENSE: NEIN
45	(vi) URSPRUNGSLICHE HERKUNFT:
	(A) ORGANISMUS: <i>Corynebacterium glutamicum</i>
	(B) STAMM: ATCC13032
	(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: MUTANTE R127
50	(ix) MERKMAL:
	(A) NAME/SCHLUESSEL: CDS
	(B) LAGE: 290..2125
	(D) SONSTIGE ANGABEN: /codon_start= 290 /EC_number= 4.2.1.9 /product= "Dihydroxysaeuredehydratase" /gene= "ilvD"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

5	AGTACTTGGA GCGCCAAAAG GCACCTGGCA AGCCAGTTCA GTTGAACCTC GATGACGACA	60
	CCGATGGGAA TACAACACAA ACAGAAAGCG TTGAATCCCA AGAGACCGGA CAAGCCGCGT	120
	CTGAAACCTC ACATCGTGAT AACCTGCGT CACAGCACTA GAGTGTAAATA AGCCGTCCGA	180
	ACCAAAGGTC CACACCTCTG CACGAGTAGA AGCTCACCCA AGTTTCAAA GTGCCGTTGA	240
10	TTCTTGACAA CCACCCGCCG CTCTTTAGAG CAGATTTGAA AAGCGCATC ATG ATC Met Ile 280	295
	CCA CTT CGT TCA AAA GTC ACC ACC GTC GGT CGC AAT GCA GCT GGC GCT Pro Leu Arg Ser Lys Val Thr Thr Val Gly Arg Asn Ala Ala Gly Ala 285 290 295	343
15	CGC GCC CTT TGG CGT GCC ACC GGC ACC AAG GAA AAT GAG TTC GGC AAG Arg Ala Leu Trp Arg Ala Thr Gly Thr Lys Glu Asn Glu Phe Gly Lys 300 305 310	391
20	CCA ATT GTT GCC ATC GTA AAC TCC TAC ACC CAG TTC GTG CCC GGA CAC Pro Ile Val Ala Ile Val Asn Ser Tyr Thr Gln Phe Val Pro Gly His 315 320 325	439
	GTT CAC CTT AAG AAC GTC GGC GAT ATT GTG GCA GAT GCA GTG CGC AAA Val His Leu Lys Asn Val Gly Asp Ile Val Ala Asp Ala Val Arg Lys 330 335 340 345	487
25	GCC GGT GGC GTT CCA AAG GAA TTC AAC ACC ATC GTC GAT GAC GGC ATC Ala Gly Gly Val Pro Lys Glu Phe Asn Thr Ile Val Asp Asp Gly Ile 350 355 360	535
	GCC ATG GGA CAC GGC GGC ATG CTG TAC TCC CTG CCA TCC CGT GAA ATC Ala Met Gly His Gly Met Leu Tyr Ser Leu Pro Ser Arg Glu Ile 365 370 375	583
30	ATC GCC GAC TCC GTC GAA TAC ATG GTC AAC GCA CAC ACC GCC GAC GCC Ile Ala Asp Ser Val Glu Tyr Met Val Asn Ala His Thr Ala Asp Ala 380 385 390	631
	ATG GTG TGT ATC TCC AAC TGT GAC AAG ATC ACC CCA GGC ATG CTC AAC Met Val Cys Ile Ser Asn Cys Asp Lys Ile Thr Pro Gly Met Leu Asn 395 400 405	679
35	GCA GCA ATG CGC CTG AAC ATC CCA GTG GTC TTC GTT TCC GGT GGC CCA Ala Ala Met Arg Leu Asn Ile Pro Val Val Phe Val Ser Gly Gly Pro 410 415 420 425	727
40	ATG GAA GCT GGC AAG GCT GTC GTC GTT GAG CGC GTT GCA CAC GCA CCA Met Glu Ala Gly Lys Ala Val Val Glu Arg Val Ala His Ala Pro 430 435 440	775
	ACC GAC CTC ATC ACC GCG ATC TCC GCA TCC GCA AGC GAT GCA GTC GAC Thr Asp Leu Ile Thr Ala Ile Ser Ala Ser Ala Ser Asp Ala Val Asp 445 450 455	823
45	GAC GCA GGC CTT GCA GCC GTT GAA CGA TCC GCA TGC CCA ACC TGT GGC Asp Ala Gly Leu Ala Ala Val Glu Arg Ser Ala Cys Pro Thr Cys Gly 460 465 470	871
	TCC TGC TCC GGT ATG TTC ACC GCG AAC TCC ATG AAC TGC CTC ACC GAA Ser Cys Ser Gly Met Phe Thr Ala Asn Ser Met Asn Cys Leu Thr Glu 475 480 485	919
50	GCT CTG GGA CTT TCT CTC CCG GGC AAC GGC TCC ACT CTG GCA ACC CAC	967

EP 1 006 189 A2

	Ala Leu Gly Leu Ser Leu Pro Gly Asn Gly Ser Thr Leu Ala Thr His		
490	495	500	
5	GCA GCA CGT CGC GCA CTG TTT GAA AAG GCC GGC GAA ACC GTC GTT GAA Ala Ala Arg Arg Ala Leu Phe Glu Lys Ala Gly Glu Thr Val Val Glu	1015	
	510	515	520
	CTG TGC CGC CGC TAC TAC GGT GAA GAA GAC GAA TCC GTT CTG CCA CGT Leu Cys Arg Arg Tyr Tyr Gly Glu Asp Glu Ser Val Leu Pro Arg	1063	
10	525	530	535
	GGC ATT GCC ACC AAG AAG GCA TTC GAA AAC GCA ATG GCA CTG GAT ATG Gly Ile Ala Thr Lys Lys Ala Phe Glu Asn Ala Met Ala Leu Asp Met	1111	
	540	545	550
15	GCC ATG GGT GGA TCC ACC AAC ACC ATC CTC CAC ATC CTC GCA GCT GCC Ala Met Gly Gly Ser Thr Asn Thr Ile Leu His Ile Leu Ala Ala Ala	1159	
	555	560	565
	CAG GAA GGC GAA GTT GAC TTC GAC CTC GCA GAC ATC GAC GAA CTG TCC Gln Glu Gly Glu Val Asp Phe Asp Leu Ala Asp Ile Asp Glu Leu Ser	1207	
20	570	575	580
	585		
	AAA AAC GTC CCC TGC CTG TCC AAG GTT GCA CCA AAC TCC GAC TAC CAC Lys Asn Val Pro Cys Leu Ser Lys Val Ala Pro Asn Ser Asp Tyr His	1255	
	590	595	600
25	ATG GAA GAC GTC CAC CGC GCC GGT CGC ATT CCA GCA CTG CTC GGC GAG Met Glu Asp Val His Arg Ala Gly Arg Ile Pro Ala Leu Leu Gly Glu	1303	
	605	610	615
	CTC AAC CGC GGT GGC CTG CTG AAC AAG GAC GTC CAC TCC GTT CAC TCC Leu Asn Arg Gly Gly Leu Leu Asn Lys Asp Val His Ser Val His Ser	1351	
	620	625	630
	AAC GAC CTT GAA GGT TGG TTG GAT GAC TGG GAT ATC CGC TCT GGC AAG Asn Asp Leu Glu Gly Trp Leu Asp Asp Trp Asp Ile Arg Ser Gly Lys	1399	
30	635	640	645
	660		
	ACC ACC GAA GTA GCA ACC GAA CTC TTC CAC GCA GCC CCA GGT GGC ATC Thr Thr Glu Val Ala Thr Glu Leu Phe His Ala Ala Pro Gly Gly Ile	1447	
	650	655	660
35	665		
	CGC ACC ACC GAA GCA TTC TCC ACC GAG AAC CGC TGG GAC GAA CTC GAC Arg Thr Thr Glu Ala Phe Ser Thr Glu Asn Arg Trp Asp Glu Leu Asp	1495	
	670	675	680
	685		
	ACC GAC GCT GCC AAG GGC TGC ATC CGC GAC GTT GAA CAC GCC TAC ACC Thr Asp Ala Ala Lys Gly Cys Ile Arg Asp Val Glu His Ala Tyr Thr	1543	
	690		
40	695		
	GCC GAC GGC GGC CTG GTT CTT CGC GGC AAC ATC TCC CCT GAC GGC Ala Asp Gly Gly Leu Val Val Leu Arg Gly Asn Ile Ser Pro Asp Gly	1591	
	700	705	710
	715	720	725
45	GCA GTG ATC AAG TCC GCA GGT ATC GAA GAA GAG CTG TGG AAC TTC ACC Ala Val Ile Lys Ser Ala Gly Ile Glu Glu Leu Trp Asn Phe Thr	1639	
	730	735	740
	745		
50	CTG ACC AAG ACC ATC CAA CCT GGC GAA GTT CTG GTC GTC CGC TAC GAA Leu Thr Lys Thr Ile Gln Ala Gly Glu Val Leu Val Val Arg Tyr Glu	1735	
	750	755	760
	GGC CCA TCA GGT GGA CCA GGC ATG CAG GAA ATG CTT CAC CCA ACC GCA 55	1783	

EP 1 006 189 A2

	Gly Pro Ser Gly Gly Pro Gly Met Gln Glu Met Leu His Pro Thr Ala	
	765 770 775	
5	TTC CTC AAG GGA TCC GGC CTG GGC AAG AAG TGT GCA CTG ATC ACC GAC Phe Leu Lys Gly Ser Gly Leu Gly Lys Lys Cys Ala Leu Ile Thr Asp	1831
	780 785 790	
	GGC CGT TTC TCC GGA GGT TCC TCA GGA CTG TCC ATC GGC CAC GTC TCC Gly Arg Phe Ser Gly Gly Ser Ser Gly Leu Ser Ile Gly His Val Ser	1879
	795 800 805	
10	CCA GAA GCA GCA CAC GGC GGA GTC ATT GGT CTG ATC GAA AAC GGC GAC Pro Glu Ala Ala His Gly Gly Val Ile Gly Leu Ile Glu Asn Gly Asp	1927
	810 815 820 825	
	ATC GTC TCC ATC GAC GTT CAC AAC CGC AAG CTC GAA GTT CAG GTC TCC Ile Val Ser Ile Asp Val His Asn Arg Lys Leu Glu Val Gln Val Ser	1975
15	830 835 840	
	GAC GAG GAA CTC CAG CGC CGC GAC GCT ATG AAC GCC TCC GAG AAG Asp Glu Glu Leu Gln Arg Arg Asp Ala Met Asn Ala Ser Glu Lys	2023
	845 850 855	
20	CCA TGG CAG CCA GTC AAC CGT AAC CGC GTT GTC ACC AAG GCA CTG CGC Pro Trp Gln Pro Val Asn Arg Asn Arg Val Val Thr Lys Ala Leu Arg	2071
	860 865 870	
	GCA TAC GCA AAG ATG GCT ACC TCC GCT GAT AAG GGT GCA GTC CGT CAG Ala Tyr Ala Lys Met Ala Thr Ser Ala Asp Lys Gly Ala Val Arg Gln	2119
	875 880 885	
25	GTC GAC TAACCCCTTG TGAGTGTGTTG AGCACCGGTT CCCTACTTTG GGTTCCGGTG Val Asp	2175
	890	
	CTTTTCATG TCTTGGCCTG TGTGGCGTG GTGGAGCTCC CCGTTGCAAA TACTCACCAC	2235
30	AAGTTGCAGG ATTTCTGCTG GTTGTGGTGG ATTTTCCCGC TTTATAGCCC TATGCGTGCA	2295
	ACTTTCGGAC CGATTCCAAA GGGCAAAGCC CTGTTGTGG TGGATCCTTG CCCTGGAAGC	2355
	TTTCAGGAAC CACAACCTACC CCACTGACCC CAAAGTGGAT AGGCCCTATT CTTCCGTTA	2415
35	AGCGCCTCAA ACACCTCTCC CCACACTTGA CCCATTAGGC AATTACGAAT CCTTAAACAG	2475
	CCTTCTACAG CACCATGCC CAAACCGAAC CCAGGCATGA AAAAGACCCCT CACCAGGAGG	2535
	GTCTTTTCTT AAAACTTGG CTACCGGATT GGGTTCACAC CCCGACCGAA CCACCACAGC	2595
	AGAAACTGCCG CTGCGATGCC GATGACCACG AAGATCCACG AGTCACCAAG TGGACGCTTT	2655
40	GCCCAACCTC GGCCAGAGTC AAGGGAAATC TTGCCGGGGC CGGTGAAC TG AAGTCCGACA	2715
	ACCACGATAG TGAGGATCAG TGCCAGCATC AATGGCTCAC TAAGTTCAC CCAACCACCT	2775
	TCATGAGTGT TGACTTGGTG AAGGGTGGTA AAGGATGTG TG CCACCGTGGC TACCGCTGCT	2835
45	GCCACTGGGG TGTCATCAGACC AAGGAGCAGG AAGACACCAAG CCGCAAGTTC AATAGATGGA	2895
	AGCAGGATCG CGAGGATTC AGGCCACTGG TAACCAGCGA ACTCTGCCTC GACTCTA	2952

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

50 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LAENGE: 612 Aminosaeuren  
 (B) ART: Aminosaeure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein  
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

5 Met Ile Pro Leu Arg Ser Lys Val Thr Thr Val Gly Arg Asn Ala Ala  
 1 5 10 15

Gly Ala Arg Ala Leu Trp Arg Ala Thr Gly Thr Lys Glu Asn Glu Phe  
 20 25 30

Gly Lys Pro Ile Val Ala Ile Val Asn Ser Tyr Thr Gln Phe Val Pro  
 10 35 40 45

Gly His Val His Leu Lys Asn Val Gly Asp Ile Val Ala Asp Ala Val  
 50 55 60

Arg Lys Ala Gly Gly Val Pro Lys Glu Phe Asn Thr Ile Val Asp Asp  
 15 65 70 75 80

Gly Ile Ala Met Gly His Gly Met Leu Tyr Ser Leu Pro Ser Arg  
 85 90 95

Glu Ile Ile Ala Asp Ser Val Glu Tyr Met Val Asn Ala His Thr Ala  
 20 100 105 110

Asp Ala Met Val Cys Ile Ser Asn Cys Asp Lys Ile Thr Pro Gly Met  
 115 120 125

Leu Asn Ala Ala Met Arg Leu Asn Ile Pro Val Val Phe Val Ser Gly  
 30 130 135 140

Gly Pro Met Glu Ala Gly Lys Ala Val Val Val Glu Arg Val Ala His  
 145 150 155 160

Ala Pro Thr Asp Leu Ile Thr Ala Ile Ser Ala Ser Ala Ser Asp Ala  
 165 170 175

Val Asp Asp Ala Gly Leu Ala Ala Val Glu Arg Ser Ala Cys Pro Thr  
 35 180 185 190

Cys Gly Ser Cys Ser Gly Met Phe Thr Ala Asn Ser Met Asn Cys Leu  
 195 200 205

Thr Glu Ala Leu Gly Leu Ser Leu Pro Gly Asn Gly Ser Thr Leu Ala  
 35 210 215 220

Thr His Ala Ala Arg Arg Ala Leu Phe Glu Lys Ala Gly Glu Thr Val  
 40 225 230 235 240

Val Glu Leu Cys Arg Arg Tyr Tyr Gly Glu Glu Asp Glu Ser Val Leu  
 245 250 255

Pro Arg Gly Ile Ala Thr Lys Lys Ala Phe Glu Asn Ala Met Ala Leu  
 45 260 265 270

Asp Met Ala Met Gly Gly Ser Thr Asn Thr Ile Leu His Ile Leu Ala  
 275 280 285

Ala Ala Gln Glu Gly Glu Val Asp Phe Asp Leu Ala Asp Ile Asp Glu  
 45 290 295 300

Leu Ser Lys Asn Val Pro Cys Leu Ser Lys Val Ala Pro Asn Ser Asp  
 50 305 310 315 320

Tyr His Met Glu Asp Val His Arg Ala Gly Arg Ile Pro Ala Leu Leu  
 325 330 335

Gly Glu Leu Asn Arg Gly Gly Leu Leu Asn Lys Asp Val His Ser Val

	340	345	350
5	His Ser Asn Asp Leu Glu Gly Trp Leu Asp Asp Trp Asp Ile Arg Ser 355 360 365		
	Gly Lys Thr Thr Glu Val Ala Thr Glu Leu Phe His Ala Ala Pro Gly 370 375 380		
10	Gly Ile Arg Thr Thr Glu Ala Phe Ser Thr Glu Asn Arg Trp Asp Glu 385 390 395 400		
	Leu Asp Thr Asp Ala Ala Lys Gly Cys Ile Arg Asp Val Glu His Ala 405 410 415		
15	Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Leu Val Val Leu Arg Gly Asn Ile Ser Pro 420 425 430		
	Asp Gly Ala Val Ile Lys Ser Ala Gly Ile Glu Glu Glu Leu Trp Asn 435 440 445		
20	Phe Thr Gly Pro Ala Arg Val Val Glu Ser Gln Glu Glu Ala Val Ser 450 455 460		
	Val Ile Leu Thr Lys Thr Ile Gln Ala Gly Glu Val Leu Val Val Arg 465 470 475 480		
25	Tyr Glu Gly Pro Ser Gly Gly Pro Gly Met Gln Glu Met Leu His Pro 485 490 495		
	Thr Ala Phe Leu Lys Gly Ser Gly Leu Gly Lys Lys Cys Ala Leu Ile 500 505 510		
30	Thr Asp Gly Arg Phe Ser Gly Gly Ser Ser Gly Leu Ser Ile Gly His 515 520 525		
	Val Ser Pro Glu Ala Ala His Gly Gly Val Ile Gly Leu Ile Glu Asn 530 535 540		
35	Gly Asp Ile Val Ser Ile Asp Val His Asn Arg Lys Leu Glu Val Gln 545 550 555 560		
	Val Ser Asp Glu Glu Leu Gln Arg Arg Asp Ala Met Asn Ala Ser 565 570 575		
40	Glu Lys Pro Trp Gln Pro Val Asn Arg Asn Arg Val Val Thr Lys Ala 580 585 590		
	Leu Arg Ala Tyr Ala Lys Met Ala Thr Ser Ala Asp Lys Gly Ala Val 595 600 605		
45	Arg Gln Val Asp 610		

50

## Abbildungen

[0050] Folgende Abbildungen sind beigefügt:

55

Abbildung 1:

Restriktionskartierung von pUR1 und Lage des sequenzierten Fragments.

Abbildung 2:  
Restriktionskarte des Plasmids pEKEx2panBC.

Abbildung 3:  
5 Restriktionskarte des Plasmids pECM3ilvBNCD.

**Patentansprüche**

1. In Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* replizierbare, gegebenenfalls rekombinante DNA mit der Herkunft *Corynebacterium*, die zumindest eine der folgenden Nucleotidsequenzen enthält, ausgewählt aus der Gruppe:
  - 10 a) codierend für das panB-Gen (Ketopantoathydroxymethyltransferase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1,
  - b) codierend für das panC-Gen (Pantothenatsynthetase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1, insbesondere das panBC-Operon und gegebenenfalls
  - 15 c) codierend für das ilvD-Gen (Dihydroxysäuredehydratase), dargestellt durch die SEQ-ID-No.4.
2. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 1 mit:
  - 20 (i) den Nucleotidsequenzen, gezeigt in SEQ-ID-No.1, SEQ-ID-No.4,
  - (ii) mindestens einer dieser Sequenzen, die den jeweiligen Sequenzen (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entsprechen oder
  - 25 (iii) mindestens einer dieser Sequenzen, die mit den zu jeweiligen Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisieren und gegebenenfalls.
  - (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in i).
- 30 3. Mikroorganismen, insbesondere der Gattung *Corynebacterium*, transformiert durch die Einführung einer oder mehrerer der replizierbaren DNA gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2.
4. Pendelvektor (shuttle vector) pECM3ilvBNCD,  
35 gekennzeichnet  
durch die in der Abb. 3 wiedergegebene Restriktionskarte, hinterlegt als E.coli DH5 $\alpha$ mcr/pECM3ilvBNCD unter der Bezeichnung DSM 12457.
5. Pendelvektor (shuttle vector) pEKEx2panBC,  
40 gekennzeichnet  
durch die in der Abb.2 wiedergegebene Restriktionskarte, hinterlegt als E.coli DH5 $\alpha$ mcr/pEKEx2panBC unter der Bezeichnung DSM 12456.
- 45 6. Verfahren zur Herstellung von Pantothenäure,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man in den Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* das panB- und panC-Gen und gegebenenfalls weitere für die entsprechenden Enzyme codierenden Nucleotidsequenzen verstärkt (überexprimiert) und 50 diese Mikroorganismen zur Fermentation einsetzt.
7. Verfahren zur Herstellung gemäß Anspruch 6,  
dadurch gekennzeichnet,  
55 daß man zusätzlich das ilvD-Gen verstärkt (überexprimiert).
8. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 oder 7,  
dadurch gekennzeichnet,

daß man zusätzlich die Gene ilvBNCD verstärkt (überexprimiert).

9. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 oder 7,  
dadurch gekennzeichnet,  
5  
daß man zur Erzielung der Verstärkung die Kopienzahl der Gene bzw. Nucleotidsequenzen in den Mikroorganismen durch Transformation mit diesen Gene bzw. Nucleotidsequenzen tragenden Plasmidvektoren erhöht.

10. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 oder 7,  
dadurch gekennzeichnet,  
10  
daß man zur Erzielung der Verstärkung die sich stromaufwärts des Strukturgens befindende Promoter- und Regulationsregion mutiert.

15 11. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 oder 7,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man zur Erzielung der Verstärkung stromaufwärts des Strukturgens Expressionskassetten einbaut.

20 12. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 oder 7,  
dadurch gekennzeichnet,  
25  
daß man zur Erzielung der Verstärkung die Lebensdauer der mRNA, die von den oben genannten Sequenzen als Matrize abgelesen wird, verlängert und/oder den Abbau der (des) entsprechenden Enzymproteins(e) verhindert.

30 13. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 bis 12,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man die Gene gemäß Anspruch 1 in Corynebacterien überexprimiert, die weitere Metabolit- bzw. Antimetabolit-Resistenzmutationen aufweisen.

35 14. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 bis 12,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man zur Erzielung der Überexpression das Kulturmedium und/oder die Fermentationsführung ändert.

40 15. Verfahren gemäß den Ansprüche 6 bis 14,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man zumindest einen der Stoffwechselwege in den Mikroorganismen ausgeschaltet, die die Pantothenat-(Pantothenäure)-bildung verringern.

45 16. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 bis 15,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen man zusätzlich zu einem oder mehreren der Gene die übrigen Gene des Stoffwechselweges der Pantothenäurebildung, einzeln oder gemeinsam, überexprimiert.

50 17. Verfahren gemäß Anspruch 15,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man im Stoffwechselweg das ilvA-Gen ausschaltet.

55 18. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 6 bis 17,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man Mikroorganismen der Gattung Corynebacterium einsetzt, die den Pendelvektor pECM3ilvBNCD ent-

halten.

19. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 6 bis 17,  
dadurch gekennzeichnet,

5

daß man Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* einsetzt, die den Pendelvektor pEKEx2panBC enthalten.

20. Verfahren zur Herstellung von Pantothenäsäure durch Fermentation von Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man

15 a) zumindest eines der Gene panB oder panC, bevorzugt panBC, gegebenfalls in Kombination mit dem ilvD-Gen, verstärkt (überexprimiert), und  
b) die Pantothenäsäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen anreichert, und  
c) die Pantothenäsäure isoliert.

21. Verfahren gemäß den Ansprüchen 19 und 20,  
20 dadurch gekennzeichnet,

daß man während der Fermentation eine Vorstufe der Pantothenäsäure zusetzt, ausgewählt aus der Gruppe Aspartat,  $\beta$ -Alanin, Ketoisovalerat, Ketopantoat oder Pantoat.

25

30

35

40

45

50

55

Abbildung 1

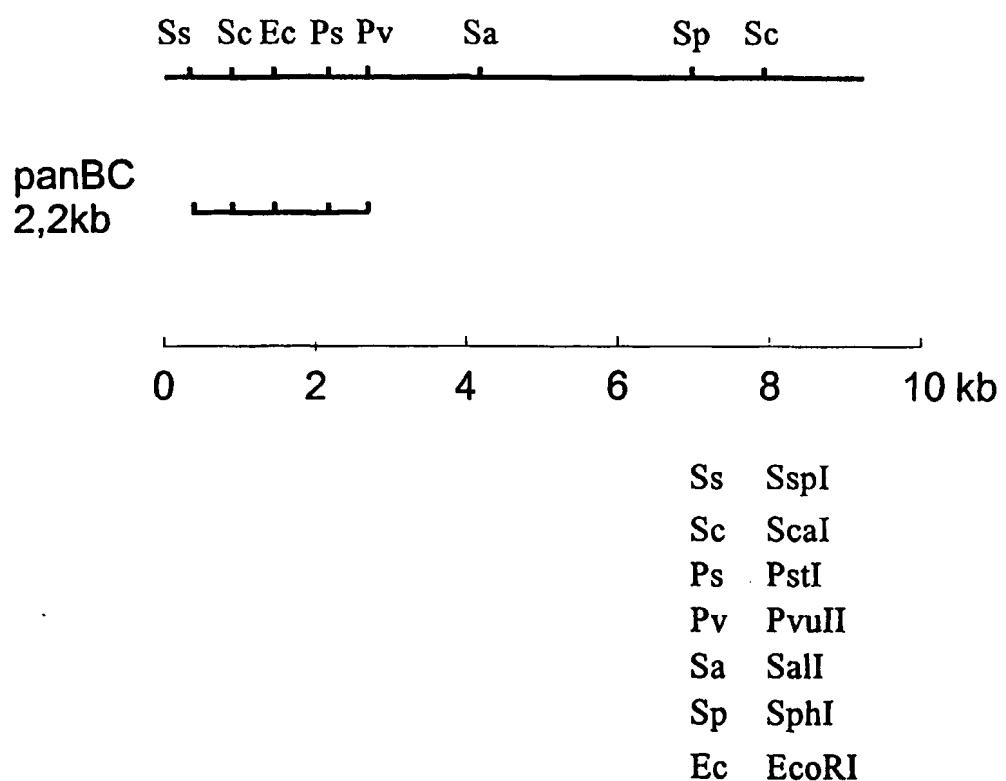


Abbildung 2

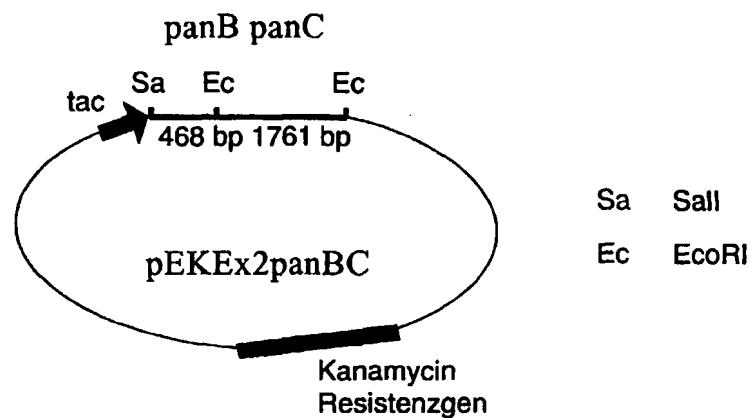
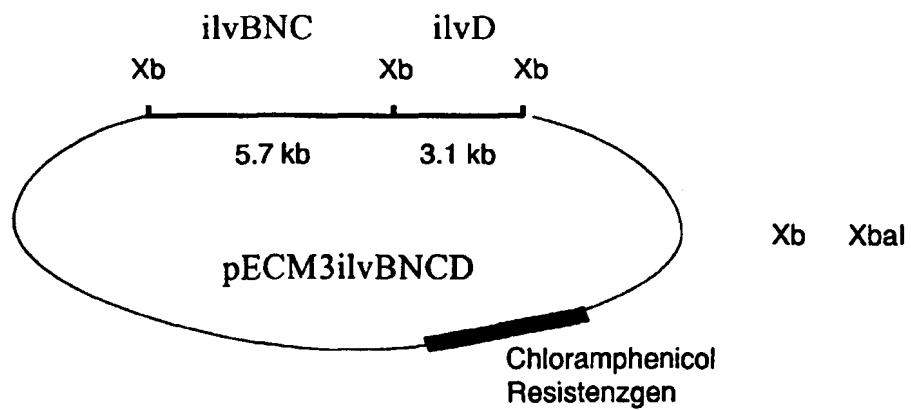


Abbildung 3





(19)

Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11) EP 1 006 189 A3

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(88) Veröffentlichungstag A3:  
17.09.2003 Patentblatt 2003/38

(51) Int Cl.7: C12N 15/52, C12N 15/54,  
C12N 15/60, C12N 15/77,  
C12P 13/02, C12N 9/00,  
C12N 9/10, C12N 9/88,  
C12R 1/15

(43) Veröffentlichungstag A2:  
07.06.2000 Patentblatt 2000/23

// C12N1/21,(C12R1/15, 1:19)

(21) Anmeldenummer: 99123738.9

(22) Anmeldetag: 30.11.1999

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
MC NL PT SE

• Forschungszentrum Jülich GmbH  
52425 Jülich (DE)

Benannte Erstreckungsstaaten:  
AL LT LV MK RO SI

(72) Erfinder:

- Eggeling, Lothar, Dr.  
52428 Jülich (DE)
- Thierbach, Georg, Dr.  
33613 Bielefeld (DE)
- Sahm, Herrmann, Prof.Dr.  
52428 Jülich (DE)

(30) Priorität: 01.12.1998 DE 19855312

(71) Anmelder:

- Degussa AG  
40474 Düsseldorf (DE)

### (54) Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothensäure unter Verwendung coryneformer Bakterien

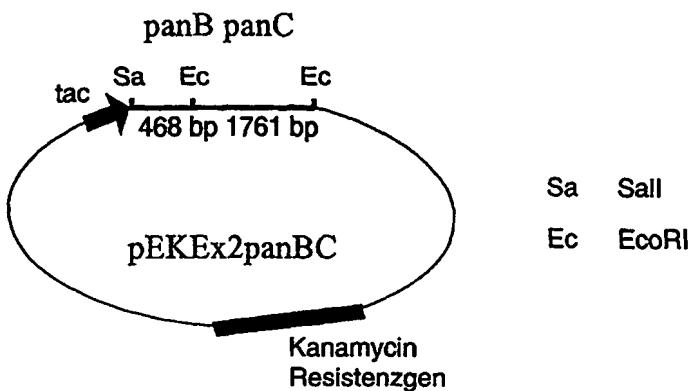
(57) Die Erfindung betrifft in Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* replizierbare, gegebenenfalls rekombinante DNA mit der Herkunft *Corynebacterium*, die zumindest eine der folgenden Nucleotidsequenzen enthält, ausgewählt aus der Gruppe:

b) codierend für das panC-Gen (Pantothensäure-Synthetase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1, insbesondere das panBC-Operon und gegebenenfalls  
c) codierend für das ilvD-Gen (Dihydroxysäuredehydratase), dargestellt durch die SEQ-ID-No.4,

a) codierend für das panB-Gen (Ketopantoathydroxymethyltransferase), dargestellt in der SEQ-ID-No. 1,

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothensäure unter Verwendung von Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium*, in denen die genannten Gene verstärkt werden.

Abbildung 2





EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betritt Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
X	EP 0 590 857 A (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 6. April 1994 (1994-04-06) * Zusammenfassung; Ansprüche * * Seite 13, Zeile 53 - Seite 14, Zeile 9 * ---	1-3,6, 9-16,20, 21	C12N15/52 C12N15/54 C12N15/60 C12N15/77 C12P13/02 C12N9/00 C12N9/10 C12N9/88 C12R1/15 //C12N1/21, (C12R1/15, 1:19)
X	US 5 518 906 A (HIKICHI YUICHI ET AL) 21. Mai 1996 (1996-05-21) * Zusammenfassung; Ansprüche * * Spalte 8, Zeile 21 - Zeile 47 * * Spalte 14, Zeile 11 - Zeile 15 * ---	1-3,6, 9-16,20, 21	
P,X	SAHM HERMANN ET AL: "D-pantothenate synthesis in Corynebacterium glutamicum and use of panBC and genes encoding L-valine synthesis for D-pantothenate overproduction" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, Bd. 65, Nr. 5, Mai 1999 (1999-05), Seiten 1973-1979, XP002138605 ISSN: 0099-2240 * das ganze Dokument * ---	1-21	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7) C12N
E	EP 1 006 192 A (DEGUSSA) 7. Juni 2000 (2000-06-07) SEQ ID N°3 * Seite 15 - Seite 18; Beispiel 2 * ---	1-21	
E	WO 01 00843 A (BASF AG) 4. Januar 2001 (2001-01-04) SEQ ID N°613, 615, 279, 281, 617 * Seite 1028 - Seite 1029; Anspruch 3 * * Seite 1030 - Seite 1031 * * Seite 565 - Seite 566 * * Seite 1032 - Seite 1034 * * Seite 567 - Seite 568 * ---	1-5	
-/-			
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort <b>MÜNCHEN</b>	Abschlußdatum der Recherche <b>29. Juli 2003</b>	Prüfer <b>Pilat, D</b>	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtamtliche Offenbarung P : Zwischenfikatur			



Europäisches  
Patentamt

## EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 99 12 3738

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE									
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betreff Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)						
E	<p>WO 00 50624 A (EGGELING LOTHAR ;SAHM HERMANN (DE); KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH () 31. August 2000 (2000-08-31)</p> <p>* Seite 3, Zeile 1 - Zeile 9 *</p> <p>* Seite 9, Zeile 23 - Zeile 27 *</p> <p>* Ansprüche *</p> <p>-----</p>	1-5							
RECHERCHIERTE SACHGEBiete (Int.Cl.7)									
<p>Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 33%;">Recherchenort</td> <td style="width: 33%;">Abschlußdatum der Recherche</td> <td style="width: 34%;">Prüfer</td> </tr> <tr> <td>MÜNCHEN</td> <td>29. Juli 2003</td> <td>Pilat, D</td> </tr> </table> <p><b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</b></p> <p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet  Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie  A : technologischer Hintergrund  O : nichtchriftliche Offenbarung  P : Zwischenliteratur</p> <p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze  E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist  D : in der Anmeldung angeführtes Dokument  L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument</p> <p>&amp; : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>				Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	MÜNCHEN	29. Juli 2003	Pilat, D
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer							
MÜNCHEN	29. Juli 2003	Pilat, D							

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT  
ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 99 12 3738

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am  
Diese Angaben dienen nur zur Orientierung und erfolgen ohne Gewähr.

29-07-2003

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0590857	A	06-04-1994	CN	1095105 A ,B	16-11-1994
			CN	1225394 A ,B	11-08-1999
			CN	1225388 A	11-08-1999
			CN	1225392 A	11-08-1999
			CN	1225358 A ,B	11-08-1999
			EP	0590857 A2	06-04-1994
			JP	6261772 A	20-09-1994
			US	5518906 A	21-05-1996
<hr/>					
US 5518906	A	21-05-1996	CN	1095105 A ,B	16-11-1994
			CN	1225394 A ,B	11-08-1999
			CN	1225388 A	11-08-1999
			CN	1225392 A	11-08-1999
			CN	1225358 A ,B	11-08-1999
			EP	0590857 A2	06-04-1994
			JP	6261772 A	20-09-1994
<hr/>					
EP 1006192	A	07-06-2000	DE	19855313 A1	08-06-2000
			BR	9905776 A	24-04-2001
			CN	1256314 A	14-06-2000
			EP	1006192 A2	07-06-2000
			HU	9904447 A2	28-11-2000
			JP	2000228990 A	22-08-2000
			KR	2000047829 A	25-07-2000
			SK	163399 A3	11-07-2000
			US	6184007 B1	06-02-2001
			ZA	9907406 A	08-06-2000
<hr/>					
WO 0100843	A	04-01-2001	AU	5421300 A	31-01-2001
			BR	0011806 A	14-05-2002
			CA	2383865 A1	04-01-2001
			CN	1371417 T	25-09-2002
			EP	1257649 A2	20-11-2002
			ES	2177475 T1	16-12-2002
			WO	0100843 A2	04-01-2001
			SK	18862001 A3	06-11-2002
			TR	200103707 T2	23-09-2002
			AU	5559000 A	31-01-2001
			BR	0011805 A	14-05-2002
			CA	2383875 A1	04-01-2001
			CN	1370235 T	18-09-2002
			EP	1263963 A2	11-12-2002
			ES	2178979 T1	16-01-2003
			WO	0100844 A2	04-01-2001
			JP	2003517291 T	27-05-2003
			SK	18872001 A3	03-12-2002

EPO FORM P0481

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT  
ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 99 12 3738

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am  
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

29-07-2003

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0100843 A			
TR 200103706 T2	21-10-2002		
US 2003049804 A1	13-03-2003		
AU 5836900 A	31-01-2001		
BR 0011811 A	18-06-2002		
CA 2380870 A1	04-01-2001		
EP 1290178 A2	12-03-2003		
ES 2184658 T1	16-04-2003		
HU 0203340 A2	28-01-2003		
WO 0100804 A2	04-01-2001		
SK 18882001 A3	10-09-2002		
TR 200103709 T2	21-08-2002		
AU 5421600 A	31-01-2001		
BR 0011810 A	07-05-2002		
CA 2380863 A1	04-01-2001		
CN 1370236 T	18-09-2002		
EP 1255839 A2	13-11-2002		
ES 2177476 T1	16-12-2002		
WO 0100805 A2	04-01-2001		
SK 18912001 A3	08-10-2002		
TR 200103708 T2	21-08-2002		
AU 5420500 A	31-01-2001		
BR 0011803 A	09-04-2002		
CA 2380871 A1	04-01-2001		
CN 1370234 T	18-09-2002		
EP 1254232 A2	06-11-2002		
ES 2176128 T1	01-12-2002		
HU 0203647 A2	28-01-2003		
WO 0100842 A2	04-01-2001		
SK 18902001 A3	10-09-2002		
TR 200103711 T2	22-07-2002		
-----			
WO 0050624 A 31-08-2000	DE 19907567 A1	24-08-2000	
	AT 236991 T	15-04-2003	
	CZ 20013037 A3	16-01-2002	
	DE 50001708 D1	15-05-2003	
	WO 0050624 A1	31-08-2000	
	EP 1155139 A1	21-11-2001	
	JP 2002537771 A	12-11-2002	
	SK 12052001 A3	07-01-2002	
-----			